

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Hämoxygenase-2 reguliert die
Öffnungswahrscheinlichkeit des Kaliumkanals TREK-1
durch die Produktion von Kohlenstoffmonoxid**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kristin Koschinsky
aus Zittau

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24.08.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Frau PD Dr. R. Preisig-Müller

1. Korreferent: Frau PD Dr. C. Rolfes

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Kaliumkanäle	1
1.2 Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K _{2P} -Kanäle)	2
1.3 Der TREK-1 Kanal.....	4
1.3.1 Regulation von TREK-1	4
1.3.2 Physiologie und Pathophysiologie von TREK-1 Kanälen	12
1.4 Das Häm-Hämoxygenase System.....	14
1.4.1 Häm.....	14
1.4.2 Hämoxygenasen.....	15
1.4.3 Produkte – Biliverdin, Fe ²⁺ und Kohlenstoffmonoxid	18
1.5 Fragestellung.....	20
 2. Material und Methoden	 22
2.1 Material.....	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 Transformation von Bakterien	29
2.2.2 Plasmidisolierung aus Bakterien.....	30
2.2.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung im NanoDrop.....	30
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.5 DNA Sequenzierung.....	32
2.2.6 Ortsgerichtete Mutagenese	32
2.2.7 PCR-Aufreinigung der DNA.....	33
2.2.8 Agarosegelextraktion.....	33
2.2.9 DNA Verdau und Ligation.....	33
2.2.10 cRNA Synthese	35
2.3 Elektrophysiologische Methoden	36
2.3.1 Injektion von cRNA in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	36
2.3.2 Voltage-Clamp Messungen in <i>Xenopus</i> Oozyten	37
2.3.3 Giant-Patch Messungen in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	38
2.3.4 Patch-Clamp Messungen in HEK293 Zellen	39
2.3.5 Verwendung von CO und NO in elektrophysiologischen Messungen	41
2.4 Oberflächenexpressionsanalyse in <i>Xenopus</i> Oozyten	43

2.5 Statistik	44
2.6 Expressionsanalyse	45
2.6.1 Reverse Transkription	45
2.6.2 Qualitative PCR	45
2.7 Zellkultur	47
2.8 Proteinbiochemische Methoden	49
2.8.1 Proteinisolierung aus HeLa Zellen	49
2.8.2 Proteinquantifizierung: BCA Protein Assay	50
2.8.3 Koimmunopräzipitation	51
2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.8.5 Westernblot	53
2.9 Hefe-Zwei-Hybrid System	54
2.9.1 Hefe Transformation	55
2.9.2 Hefe Spotting	56
2.9.3 X-Gal Assay	56
3. Ergebnisse	58
3.1 Untersuchungen der Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2	58
3.1.1 Koimmunopräzipitation von TREK-1 und HO-2	58
3.1.2 Direkte Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2	59
3.1.3 TREK-1 Strommessungen nach Koexpression von HO-2	61
3.1.4 Oberflächenexpression von TREK-1 nach Koexpression mit HO-2	62
3.1.5 Expressionsanalyse endogener HO-2 in <i>Xenopus</i> Oozyten	63
3.1.6 Wirkung von Hämin auf HO-2 und auf den TREK-1 Strom	64
3.1.7 Wirkung von Zinkprotoporphyrin (ZnPP) auf HO-2 und TREK-1	66
3.2 Untersuchungen mit Kohlenstoffmonoxid (CO)	67
3.2.1 Wirkung von CO auf den TREK-1 Strom in <i>Xenopus</i> Oozyten	67
3.2.2 Wirkung von CO auf den TREK-1 Strom in HEK293 Zellen	69
3.2.3 Signalwege, die der Wirkung von CO zugrunde liegen könnten	71
3.3 Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) auf TREK-1	79
3.4 Direkte CO-Wirkung auf den TREK-1 Kanal	81
3.4.1 Giant-Patch Messungen von TREK-1 nach Zugabe von CO	81
3.4.2 Wirkung von CO auf weitere Cysteine im TREK-1 Kanal	84
3.5 Wirkung von CO auf andere Kaliumkanäle	85

4. Diskussion	87
4.1 Die Interaktion von TREK-1 mit HO-2.....	87
4.2 Funktionelle Auswirkungen von HO-2 auf den TREK-1 Strom	88
4.3 Zugabe von Hämin als Substrat der HO-2	89
4.4 Hemmung der HO-2 durch Zinkprotoporphyrin.....	90
4.5 Wirkung von CO auf TREK-1 Kanäle	90
4.6 Phosphorylierungsstatus des TREK-1 in HEK293 Zellen und <i>Xenopus</i> Oozyten	92
4.7 Suche nach dem CO-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von TREK-1	94
4.8 Die Wirkung von NO auf den TREK-1 Kanal	97
4.9 Direkte Wirkung von CO auf den TREK-1 Kanal	98
4.10 Einfluss von CO auf die Kanalaktivität weiterer Kaliumkanäle.....	99
4.11 Wie könnte eine direkte Wirkung von CO auf TREK-1 vermittelt werden?.....	100
4.12 Die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen TREK-1 and HO-2	101
 5. Zusammenfassung.....	 103
6. Summary	105
7. Literaturverzeichnis	107
8. Abkürzungsverzeichnis	121
9. Abbildungsverzeichnis	124
10. Anhang	VI
10.1 Tabellarischer Lebenslauf.....	VI
10.2 Publikationen und Kongressbeiträge	VII
10.3 Verzeichnis akademischer Lehrer	VIII
10.4 Danksagung	IX
10.5 Ehrenwörtliche Erklärung.....	X

1. Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind porenbildende Membranproteine, die eine spezifische Leitfähigkeit für Kaliumionen besitzen und einen passiven Kaliumtransport über biologische Membranen ermöglichen. Sie sind die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle und werden in fast allen erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert. Sie kontrollieren die Kaliumhomöostase und das Zellvolumen, steuern über die Regulation des Membranpotentials die Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen und modulieren die neuronale und muskuläre Erregbarkeit (Lesage & Lazdunski 2000). Ein prototypischer funktioneller Kaliumkanal besteht aus vier α -Untereinheiten, die sich aus Transmembransegmenten (TMS) und porenbildenden Regionen (P) zusammensetzen. Dabei können sich gleiche (homooligomere) und unterschiedliche (heterooligomere) Untereinheiten zusammenlagern (Doyle 1998). Die bislang identifizierten Kaliumkanäle werden in drei Hauptklassen eingeteilt, die sich in der Anzahl der Transmembrandomänen (2, 4 oder 6) der α -Untereinheiten unterscheiden. Zur Klasse der zwei Transmembrandomänen-Kaliumkanäle (2TM) gehören die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (Kir). Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv) bilden die Klasse der sechs Transmembrandomänen-Kaliumkanäle (6TM), wobei sich der Spannungssensor der Kv-Kanäle im vierten TMS befindet. Die Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle bilden die Klasse der vier Transmembrandomänen-Kaliumkanäle (4TM) (Choe 2002).

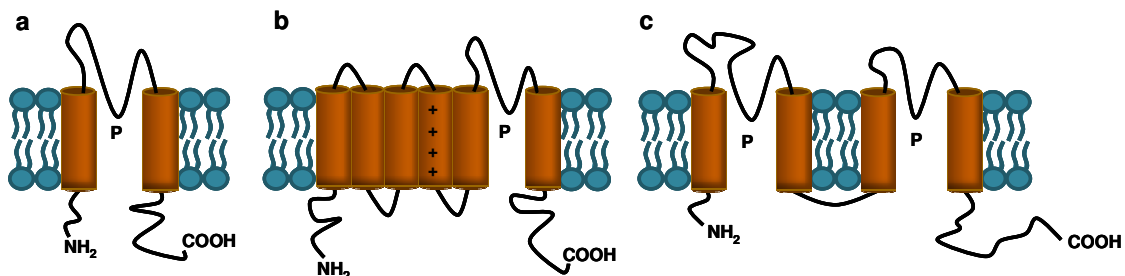


Abb. 1.1 Topologie der 3 Hauptklassen der Kaliumkanäle

a zeigt den strukturellen Aufbau einer α -Untereinheit eines einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals (Kir). **b** Struktur einer α -Untereinheit eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals (Kv). + stellt die positive Ladung des Spannungssensors im vierten Transmembransegment dar. **c** α -Untereinheit eines K_{2P}-Kanals. P: porenbildende Region; NH₂: Aminoterminus; COOH: Carboxyterminus [nach (Choe 2002)].

1.2 Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K_{2P}-Kanäle)

Die Gruppe der K_{2P}-Kanäle wurde erstmals im Jahr 1995 mit Auffinden von TOK1 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Ketchum et al. 1995). Seitdem wurden 15 Mitglieder der K_{2P}-Kanal Familie in Säugetieren entdeckt und kloniert (Ashmole, Goodwin & Stanfield 2001; Bang, Kim & Kim 2000; Chavez et al. 1999; Decher et al. 2001; Duprat et al. 1997; Fink et al. 1996; Girard et al. 2001; Kang, Mariash & Kim 2004; Kim & Gnatenco 2001; Lesage, Maingret, Lazdunski 2000; Rajan et al. 2001; Salinas et al. 1999; Sano et al. 2003; Vega-Saenz de Miera et al. 2001). Diese lassen sich aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in sechs Subfamilien unterteilen (Abb. 1.2). Die Subfamilie der mechanosensitiven Kanäle mit den Mitgliedern TRAAK, TREK-1 und TREK-2, die alkalisch aktivierten Kanäle TALK-1, TALK-2 und TASK-2, der Ca²⁺-aktivierte Kanal TRESK-1, die schwachen Einwärtsgleichrichter TWIK-2, KCNK-7 und TWIK-1, die säuresensitiven Kanäle TASK-3, TASK-1 und TASK-5 und die Halothan-inhibierten Kanäle THIK-1 und THIK-2 (Honoré 2007).

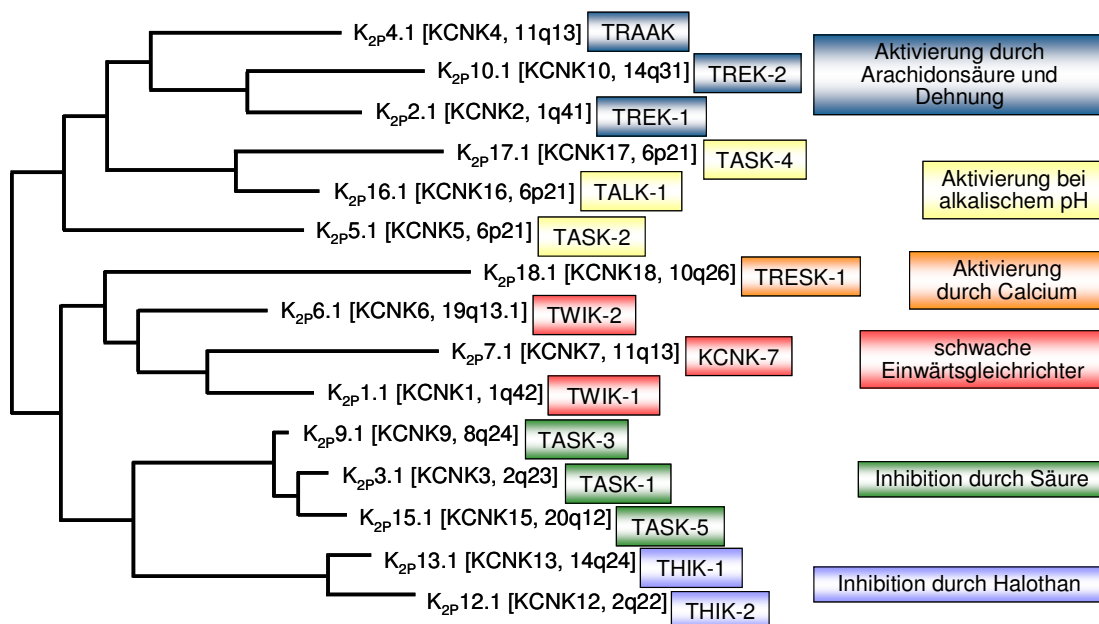


Abb. 1.2 Phylogenetischer Stammbaum der humanen K_{2P}-Kanäle

Die Abbildung zeigt die Nomenklatur, chromosomale Lokalisation und funktionellen Charakteristika der K_{2P}-Kanäle. Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften lassen sich die K_{2P}-Kanäle in sechs Untergruppen einteilen. In der porenbildenden Region besteht die größte strukturelle Homologie zwischen den einzelnen Unterfamilien [nach (Honoré 2007)].

Alle Mitglieder der K_{2P} -Kanal Familie werden aus zwei Untereinheiten aufgebaut und liegen somit als Dimere vor, wobei eine Untereinheit aus vier Transmembrandomänen, zwei porenbildenden Domänen, einem M2-M3 *linker*, einem Carboxy- und einem Aminoterminus besteht. Die porenbildenden Domänen sind kurze Aminosäuresequenzen, die sich zwischen zwei Transmembrandomänen befinden und den Selektivitätsfilter bilden, der durch die Aminosäuresequenz G-[Y/F/L]-G gekennzeichnet wird. Der relativ kurze Amino- und der längere Carboxyterminus sind intrazellulär lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle beim Transport an die Zellmembran und bei der Regulation der Aktivität der Kanäle. 2012 konnten erstmals die Kristallstrukturen des TRAAK Kanals und des TWIK-1 Kanals bestimmt werden (Brohawn, del Marmol & MacKinnon 2012; Miller & Long 2012). Diese erlauben eine tiefere Einsicht in die Struktur und die Regulation der K_{2P} -Kanäle.

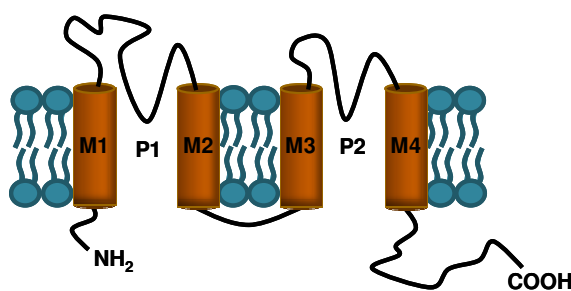


Abb. 1.3 Allgemeine Struktur der K_{2P} – Kanäle

Die Untereinheit eines K_{2P} -Kanals besteht aus 4 Transmembransegmenten (M1-M4), 2 porenbildenden Domänen (P1-P2), einem Aminoterminus (NH_2) und einem Carboxyterminus ($COOH$). Zwei Untereinheiten lagern sich als Dimer zusammen und bilden einen funktionellen K_{2P} -Kanal [nach (Plant et al. 2005)].

In der Vergangenheit wurden K_{2P} -Kanäle oft als reine Leck- oder Hintergrundkanäle bezeichnet, welche spannungs- und zeitunabhängige Aktivierungen zeigen und keine rektifizierenden Eigenschaften besitzen. In den letzten Jahren konnte hingegen gezeigt werden, dass K_{2P} -Kanäle eher nicht die Kriterien eines Hintergrundkanals erfüllen, da sie eine Spannungs- und Zeitabhängigkeit aufweisen (Enyedi & Czirjak 2010; Renigunta, Schlichthörl & Daut 2015). K_{2P} -Kanäle werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und durch eine Reihe von physikalischen und chemischen Stimuli, sowie Sauerstoffpartialdruck, Neurotransmitter, Osmolarität, Membrandehnung und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert (Talley et al. 2003).

1.3 Der TREK-1 Kanal

Zur Subfamilie der mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle gehören TREK-1 (TWIK-Related- K^+ -Channel-1), TRAAK und TREK-2. Alle drei Kanäle werden stark in vielen Regionen des Gehirns exprimiert. Die Expression von TREK-1 konnte in folgenden Geweben und Zellen nachgewiesen werden:

- in Neuronen des Kortex, Striatums, Hypothalamus, Hippocampus und der Amygdala (Fink et al. 1996; Meadows et al. 2000; Medhurst et al. 2001; Talley et al. 2001).
- in kortikalen Astrozyten, in Neuronen der Rückenmarksganglien und im Ganglion Trigeminale (Zhou et al. 2009; Medhurst et al. 2001).
- in peripheren Geweben, wie in glatten Muskelzellen des Darms und der Blase, sowie in der Gebärmutter- und Skelettmuskulatur (Medhurst et al. 2001; Baker et al. 2008; Sanders & Koh 2006; Tichenor, Hansen & Buxton 2005).
- im kardiovaskulären System in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten und im Gefäßendothel (Li et al. 2006a; Gardener et al. 2004; Garry et al. 2007).
- in Organen wie der Lunge, Niere, Nebenniere, Prostata und den Ovarien (Inglis et al. 2007; Enyeart et al. 2002; Medhurst et al. 2001; Innamaa et al. 2013; Voloshyna et al. 2008).
- in den Karotiden der Ratte (Yamamoto & Taniguchi, 2006).

1.3.1 Regulation von TREK-1

Die Regulation des Kanals findet auf verschiedenen Ebenen statt, die im Weiteren genauer beschrieben werden.

Alternatives Spleißen und alternative Translationsinitiation

Das Auftreten des alternativen Spleißens stellt einen häufigen Mechanismus zur Erhöhung der Diversität von Kaliumkanälen dar (Luneau et al. 1991). Für den TREK-1 wurden bereits sechs Spleißvarianten beschrieben, TREK-1a, -1b, -1c, -1d, -1e und TREK-1 Δ Exon4, wobei TREK-1a, -1b, -1c und -1d durch alternatives Spleißen von Exon 1 im Aminoterminal entstehen und normale

Kanalaktivität aufweisen (Li et al. 2006b; Rinné et al. 2013). Die beiden Spleißvarianten TREK-1 Δ Exon4 und TREK-1e zeigen hingegen keine Kanalaktivität, sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und regulieren den Transport funktioneller TREK-1 Kanäle an die Plasmamembran (Veale et al. 2010; Rinné et al. 2013). Die Variante TREK-1 Δ Exon4 entsteht dadurch, dass während des Spleißens das Exon 4 übersprungen wird (*exon-skipping*), was zu einer Verschiebung des Leserahmens und einem frühzeitigen Stopcodon in der Nukleotidsequenz führt. Das resultierende Protein besteht nur aus dem Aminoterminal, der ersten Transmembrandomäne, einem verkürzten Stück der ersten porenbildenden Region und weiteren 37 Aminosäuren (Veale et al. 2010). Die Spleißvariante TREK-1e entsteht ebenfalls durch *exon-skipping*, wobei in diesem Fall das Exon 5 übersprungen wird. Auch hier kommt es durch eine Verschiebung des Leserahmens zu einem verfrühten Stopcodon in der Nukleotidsequenz. Das resultierende Protein besteht aus Aminoterminal, erster und zweiter Transmembrandomäne, einer porenbildenden Region und einem neuen Carboxyterminus, der vermutlich für die ER-Retention des Proteins verantwortlich ist (Rinné et al. 2013). Interessanterweise ist die Membrantopologie von TREK-1e der von Kir-Kanälen (2TM-1P) sehr ähnlich.

Die alternative Translationsinitiation (ATI) ist ein weiterer Mechanismus, durch den die molekulare und funktionelle Komplexität der mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle erhöht werden kann (Thomas et al. 2008). Bei der ATI erkennen Ribosomen das erste Startcodon für Methionin (AUG) oft nur schwach, überspringen es und die Translationsinitiation beginnt erst an einem nachgelagerten Startcodon. Dadurch können zwei oder mehrere verschiedene Proteine aus einer mRNA entstehen. Im TREK-1 Kanal entstehen durch ATI zwei Isoformen, ein Protein in voller Länge und ein verkürztes, welchem 56 Aminosäuren im N-Terminus (bezogen auf die Spleißvariante TREK-1b) fehlen. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in der Expression im zentralen Nervensystem und während der ontogenetischen Entwicklung und besitzen unterschiedliche Funktionen. Während die „lange Form“ für Kaliumionen selektiv ist und bei Aktivierung zur Hyperpolarisation der Zellen führt, leitet die „kurze Form“ geringere Ströme bei normaler Oberflächenexpression und ist unter physiologischen Bedingungen für Kalium- und Natriumionen selektiv. Eine Expression der „kurzen Form“ in hippocampalen Neuronen der Ratte führt zu

Depolarisation des Membranpotentials der Zellen. Somit führt ATI zu einer Veränderung der Aktivität und der Ionenselektivität des TREK-1 (Thomas et al. 2008; Honore 2008).

Mechanosensitivität

Die Aktivität des TREK-1 Kanals wird durch das Zellvolumen reguliert. Zunächst wurde beschrieben, dass eine konvexe Membransausdehnung zur Aktivierung führt, während eine konkave Deformation der Plasmamembran den Kanal inhibiert (Li et al. 2006, Patel et al. 1998). Neuere Untersuchungen an artifiziellen Membranen konnten nun jedoch zeigen, dass TREK-1 sowohl durch positive, als auch durch negative Druckänderungen an der Zellmembran aktiviert wird, und dass die Mechanosensitivität direkt über die Lipidmembran vermittelt wird (Brohawn, Su & MacKinnon 2014).

Thermosensitivität

TREK-1 wird reversibel durch eine Erhöhung der Temperatur zwischen 14°C und 42°C aktiviert. Eine maximale Temperatursensitivität besteht dabei zwischen 32°C bis 37°C und führt zu einer 0,9-fachen Erhöhung der Stromamplitude pro Grad Celsius. Ein genauer Regulationsmechanismus konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, allerdings wurde bereits gezeigt, dass das vierte Transmembransegment und die nachfolgende carboxyterminale Region des TREK-1 eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Thermosensitivität spielen (Maingret et al. 2000).

Intrazelluläre und extrazelluläre pH-Änderungen

TREK-1 wird durch intrazelluläre Änderungen des pH-Wertes reguliert. Dabei führt eine intrazelluläre Azidose zu einer Aktivierung des Kanals. Die Aminosäure Glutamat an der Position 306 (bezogen auf die Spleißvariante TREK-1a) fungiert als intrazellulärer Protonensensor. Ein Austausch dieser Aminosäure durch neutrale oder positiv geladene Aminosäuren überführt den Kanal in einen konstitutiv aktiven Zustand (Honoré et al. 2002; Maingret et al. 1999; Miller 2004).

Auch extrazelluläre pH-Änderungen regulieren den humanen TREK-1 Kanal. Zwei Histidine an den Aminosäurepositionen 87 und 141 (bezogen auf humanen TREK-1b) werden durch extrazelluläre Erniedrigung des pH-Wertes protoniert, was zu einer Inhibierung des Kanals führt (Cohen et al. 2008; Sandoz et al. 2009).

Der humane TREK-1 Kanal wird somit auf beiden Seiten der Membran durch pH-Veränderungen reguliert. Allerdings wird die Aktivität des Kanals gegensätzlich beeinflusst: Während eine intrazelluläre Ansäuerung zu einer Aktivierung führt, wird der Kanal durch extrazelluläre Azidose inhibiert (Enyedi & Czirjak 2010).

Zelluläre Lipide

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. Arachidonsäure, führen zu einer Aktivierung des TREK-1 Kanals. Diese Fettsäuren sind außerdem in der Lage den Kanal für mechanische Stimulation zu sensibilisieren, d.h. Kanäle öffnen in Anwesenheit mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei geringeren Druckveränderungen an der Membran. Des weiteren beeinflussen mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Proteinkinase A (PKA)-abhängige Regulation des Kanals (Patel et al. 1998). Im Gegensatz dazu wird die Aktivität des Kanals durch gesättigte und neutrale Fettsäuren nicht verändert (Fink et al. 1998; Patel et al. 1998).

Entscheidend für die Aktivierung des Kanals durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind die ersten 28-30 Aminosäuren im proximalen Carboxyterminus des TREK-1 (Patel et al. 1998). Andererseits konnten neueste Untersuchungen an artifiziellen Membranen zeigen, dass die Aktivierung des Kanals durch Arachidonsäure, ebenso wie die Mechanosensitivität, direkt über die Lipidmembran vermittelt wird (Brohawn, Su & MacKinnon 2014).

Auch extrazelluläre Lysophospholipide führen zu einer Aktivierung von TREK-1, während intrazelluläre Lysophospholipide den Kanal inhibieren (Maingret 2000; Patel, Lazdunski & Honore 2001). Dabei ist der Effekt, den diese Lipide auf den Kanal ausüben, von der Länge der Carbonylkette und dem Vorhandensein einer polaren Kopfgruppe abhängig, jedoch unabhängig von der Ladung der Moleküle. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des TREK-1 spielt die

konische Form der extrazellulären Lysophospholipide und der Carboxyterminus des Kanals (Maingret 2000).

Lysophosphatidsäure (LPA) führt zu einer starken Aktivierung von TREK-1, allerdings nur an der intrazellulären Membran und möglicherweise durch einen intrazellulären Signalweg, vermittelt durch Phospholipase C (PLC) und Phospholipase A₂ (PLA₂). Nach einer Aktivierung mit LPA ist der Kanal nicht mehr weiter durch Spannung, pH-Änderungen und Dehnung regulierbar (Chemin et al. 2005).

Weiterhin können Phospholipide, welche am Aufbau der Lipid-Doppelschicht einer Biomembran beteiligt sind, die Aktivität des Kanals beeinflussen. Während kationische Moleküle wie Polylysine und Spermin den TREK-1 von der intrazellulären Seite inhibieren, können Phospholipide wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin die Aktivität des Kanals steigern (Chemin et al. 2005; Lopes et al. 2005). Eine Gruppe von fünf positiven Ladungen im proximalen Carboxyterminus (Aminosäuren 301-306) ist notwendig für eine Interaktion zwischen carboxyterminaler Domäne und dem inneren Blatt der Plasmamembran und somit entscheidend für die Vermittlung des Effektes (Chemin et al. 2005).

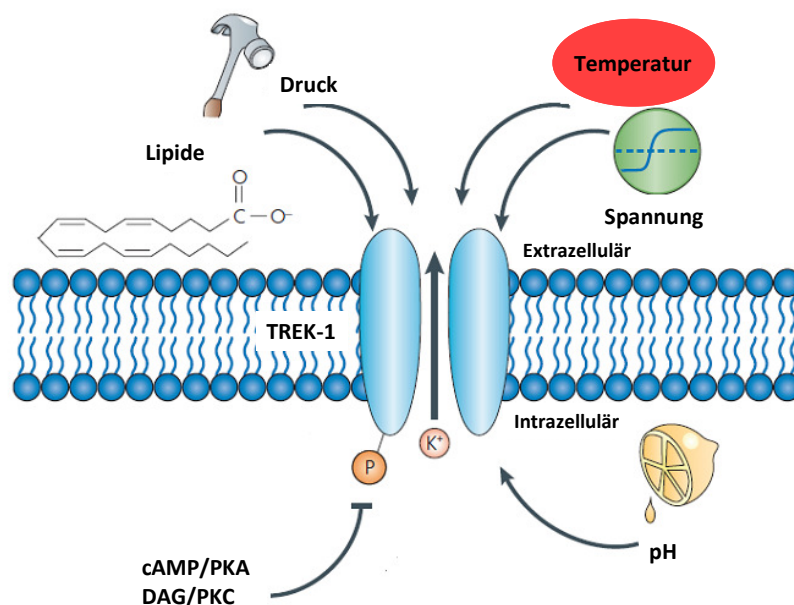


Abb. 1.4 Regulationsmechanismen von TREK-1

TREK-1 wird durch physikalische und chemische Stimuli reguliert. Die Kanalaktivität wird durch Membrandehnung, Temperaturerhöhung, intrazelluläre Azidose, Depolarisation und zelluläre Lipide gesteigert und durch Phosphorylierung via Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) gesenkt [nach (Honore 2007)].

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Phosphorylierung

Vielfach beschrieben ist die G-Protein-vermittelte Regulation von TREK-1 durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von carboxyterminal gelegenen Serinen. Diese Arten der posttranslationalen Modifikationen von Zielproteinen führen zu Ladungs- oder Konformationsänderungen oder zur Besetzung von Proteinbindungsstellen. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Kinasen spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. So führt eine Aktivierung von G_q gekoppelten Rezeptoren zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 führt zur Öffnung intrazellulärer Calciumspeicher und DAG zur Aktivierung von Proteinkinase C (PKC). Im Carboxyterminus des TREK-1 existieren mehrere Phosphorylierungsstellen. Serin an Aminosäureposition 300 (im humanen TREK-1c Serin an Position 311), welches sich an der Grenze zwischen vierter Transmembrandomäne und proximalen Carboxyterminus befindet, wird durch PKC phosphoryliert und führt zur Inhibition des Kanals (Murbartian et al. 2005). Weiterhin wird diskutiert, ob auch DAG und PIP_2 den Kanal direkt regulieren können (Chemin et al. 2003; Chemin et al. 2007; Lopes et al. 2005; Lopes et al. 2007). Eine Aktivierung der G_s -gekoppelter Rezeptoren führt hingegen zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und nachfolgend zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Letzteres aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die wiederum im TREK-1 das Serin an Aminosäureposition 333 (im humanen TREK-1c an Position 344) phosphoryliert und damit den Kanal inhibiert (Patel et al. 1998). Dabei scheint interessanterweise ein Zusammenhang zwischen einer Phosphorylierung der Serine an Position 333 und Position 300 zu bestehen (Murbartian et al. 2005). Auch die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) inhibiert den Kanal durch Phosphorylierung an den Serinresten 300 und 333 und reguliert TREK-1 in Abhängigkeit von der Stoffwechsellage der Zelle (Kreineisz et al. 2009). Weiterhin führt ein PKA-unabhängiger Mechanismus, vermittelt durch eine cAMP-abhängige Aktivierung von EPAC 2, zu einer Inhibition von TREK-1 und wurde in Zellen der Nebennierenrinde in Rindern beschrieben (Liu, Enyeart & Enyeart 2008).

Zwei bekannte Aktivatoren des Kanals sind die Gase Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO). Es wurde beschrieben, dass NO und CO durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zu einem erhöhten cGMP-Spiegel führen und dadurch die Proteinkinase G (PKG) aktivieren. Die PKG phosphoryliert TREK-1 am Serinrest 351 (im humanen TREK-1c an Position 362) und führt zu einer Aktivierung des Kanals (Dallas, Scragg & Peers 2008; Koh et al. 2001).

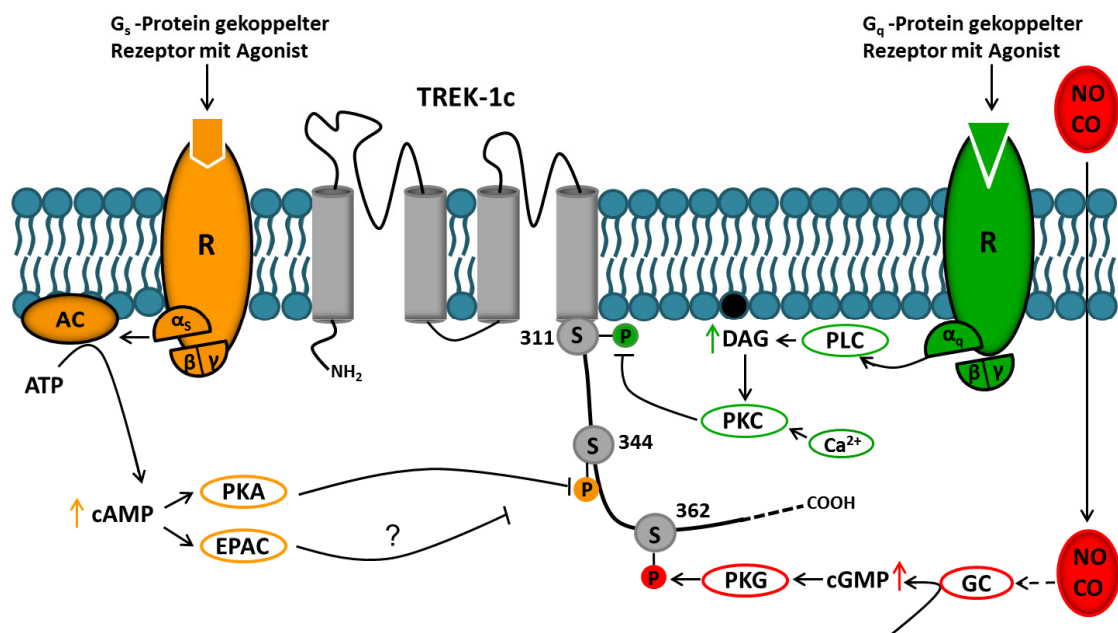


Abb. 1.5 Modulation von TREK-1 durch Phosphorylierung

Durch Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors kommt es GTP-abhängig zur Dissoziation des heterotrimeren G-Protein Komplexes in die $G\alpha$ - und die $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Die $G\alpha$ -Untereinheit eines G_s -Proteins aktiviert die membranständige Adenylatzyklase (AC), wodurch der cAMP-Spiegel steigt. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche Serin (S) an Aminosäureposition 344 im TREK-1c phosphoryliert und diesen dadurch inhibiert. Weiterhin führt ein ansteigender cAMP-Spiegel zur Aktivierung von EPAC und zur Inhibition des Kanals. Ein genauer Mechanismus ist noch nicht bekannt. Die $G\alpha$ -Untereinheit des G_q -Proteins aktiviert die Phospholipase C (PLC), diese spaltet PIP_2 in IP_3 und DAG. DAG und ein erhöhter Calciumspiegel (Ca^{2+}) aktivieren die Proteinkinase C (PKC), welche den TREK-1c an Serin (S) an Position 311 phosphoryliert und ebenfalls inhibiert. Weiterhin können Gase wie NO und CO durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (GC) zu einem erhöhten cGMP-Level und zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) führen. PKG phosphoryliert TREK-1c am Serin (S) an Position 362 und führt zu einer Aktivierung des Kanals. [nach (Enyedi & Czirjak 2010)].

Interaktionspartner

Verschiedene interagierende Proteine können die funktionellen Eigenschaften des TREK-1 Kanals regulieren. Das zelluläre Prion Protein (PrP^C) konnte bereits 2006 als Interaktionspartner des TREK-1 identifiziert werden. PrP^C ist ein Glycoprotein, welches sich in der Plasmamembran von Neuronen befindet und in seiner pathologischen Form als PrP^{SC} an der Ausbildung transmissibler spongiformer Enzephalopathien (TSE) beteiligt ist. Die physiologische Rolle dieser Interaktion ist jedoch noch nicht aufgeklärt (Azzalin et al. 2006).

Weiterhin konnte das A-Kinase-Ankerprotein (AKAP150) als Interaktionspartner für TREK-1 gefunden werden. PKA-Ankerproteine gehören zu einer Familie von Gerüstproteinen, welche in der Zellmembran verankert sind und über spezifische Domänen Proteinkinase A (PKA) sowie weitere Signalmoleküle wie z.B. weitere Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Phosphodiesterasen direkt binden können. Sie tragen damit zu einer räumlich und zeitlich koordinierten zellulären Signalverarbeitung bei (Wong & Scott 2004a). Es wurde gezeigt, dass die Aminosäuren zwischen Valin an Position 298 und Arginin an Position 313 im proximalen Carboxyterminus von TREK-1 als Interaktionsdomäne für AKAP150 fungieren. Die Interaktion führt zu einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften des auswärts rektifizierenden Kanals, der nicht weiter durch Arachidonsäure, Membrandehnung und pH-Senkung aktivierbar ist. Weiterhin bewirkt die Interaktion mit AKAP150 eine schnellere Inhibition des Kanals über Gs-gekoppelte Rezeptoren und eine verminderte Inhibition über G_q-gekoppelte Rezeptoren (Sandoz et al. 2006).

Ein weiterer bekannter Interaktionspartner ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (Mtap-2), welches die Oberflächenexpression und die Stromdichte des TREK-1 Kanals erhöht, ohne dabei die Kanaleigenschaften zu verändern. Die Bindestelle für Mtap2 befindet sich im Carboxyterminus des TREK-1 zwischen den Aminosäuren Glutamat an Position 335 und Glutamin an Position 360. Mtap-2 und AKAP150 können somit gleichzeitig an den Kanal binden und diesen regulieren, da die Interaktion an verschiedenen Positionen stattfindet (Sandoz et al. 2008).

Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass die Phospholipase D2 direkt mit dem TREK-1 Kanal interagiert und die Kanalaktivität durch lokale Produktion von Phosphatidsäure reguliert (Comoglio et al. 2014).

Außerdem können interagierende Proteine den Transport des Kanals an die Plasmamembran beeinflussen. In Kardiomyozyten konnte kürzlich das Protein Popdc (*popeye domain containig protein*) als Interaktionspartner von TREK-1 gefunden werden. Die drei Isoformen des Membranproteins werden in Herz und Skelettmuskulatur exprimiert. Popdc 1 und Popdc 2 werden dabei besonders stark in den Schrittmacherzellen und dem Reizleitungssystem des Herzens exprimiert. Popdc Proteine binden mit hoher Affinität cAMP, sind Vermittler in der β -adrenergen Signaltransduktion und haben eine wichtige Funktion bei der Regulation der Herzfrequenzdynamik. Eine Interaktion zwischen Popdc und TREK-1 führt zu einer verstärkten Expression der Kanäle an der Plasmamembran und zu einem erhöhten TREK-1 Strom (Froese et al. 2012).

Ein weiterer Interaktionspartner von TREK-1 in Kardiomyozyten ist β_{IV} -Spektrin, ein zytoskelettales Aktin-assoziiertes Protein, das den Transport und die Lokalisation des Kanals an den Glanzstreifen der Herzmuskelzellen beeinflusst. Mit Hilfe von Untersuchungen an qv^{4J} Mäusen, welche eine mutierte Form des β_{IV} -Spektrins exprimieren, die nicht mit TREK-1 interagieren kann, konnte gezeigt werden, dass eine Disruption der Interaktion zu anormaler TREK-1 Membranlokalisationen, verringerter TREK-1 Aktivität, verzögerter Repolarisation nach Aktionspotentialen und Arrhythmien führt (Hund et al. 2014).

Nicht zuletzt konnten wir kürzlich das Enzym Hämoxygenase 2 (HO-2) als einen neuen Interaktionspartner des TREK-1-Kanals identifizieren (Koschinsky 2010). Eine genauere Beschreibung der Hämoxygenase-2 erfolgt in Kap. 1.4.2.

1.3.2 Physiologie und Pathophysiologie von TREK-1 Kanälen

Um die physiologische und pathophysiologische Rolle des Kanals *in vivo* zu untersuchen, wurden viele Studien in TREK-1 knock-out-Mäusen (TREK-1^{-/-}) durchgeführt. TREK-1^{-/-} Mäuse sind gesund und fertil und weisen keine sichtbaren morphologischen Abnormalitäten auf. Allerdings konnte mit Hilfe der knock-out-Mäuse auch aufgezeigt werden, dass TREK-1 eine zentrale Rolle bei der Schmerzwahrnehmung, der Neuroprotektion, der Anästhesie und dem Auftreten von Depressionen spielt (Honoré 2007). TREK-1 wird in den Zellen der Spinalganglien exprimiert und durch nozizeptive Stimuli wie erhöhten Druck

und Hitze aktiviert. Eine Deletion des Kanals führt zur Allodynie und lässt vermuten, dass TREK-1 an der Feineinstellung der Nozizeptoren beteiligt ist (Alloui et al. 2006).

Auch im Herz, besonders stark im Endokard atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten, wird TREK-1 exprimiert (Terrenoire et al. 2001; Li et al. 2006b; Aimond et al. 2000; Liu & Saint 2004) und scheint an der elektromechanischen Kopplung und der Erregungsrückbildung im Herzmuskel beteiligt zu sein (Goonetilleke & Quayle 2012; Kelly et al. 2006).

Besonders stark wird TREK-1 in verschiedenen Hirnregionen exprimiert und besitzt hier eine Reihe physiologischer Funktionen. TREK-1^{-/-} Mäuse zeigen eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber Ischämie und Epilepsie. Daraus lässt sich ableiten, dass TREK-1 Kanäle eine neuroprotektive Rolle bei Ischämie und Epilepsie besitzen könnten. Eine vermehrte Freisetzung von Arachidonsäuren, ein Abfall des pH-Werts und das Anschwellen der Neuronen während einer Ischämie führen zur Öffnung des TREK-1 und damit zur Hyperpolarisation der prä- und postsynaptischen Neurone und schützen diese vor Glutamatoxizität. Auch an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke ist der TREK-1 Kanal beteiligt und reguliert die Einwanderung von Immunzellen in das Gehirn, die dort Entzündungsreaktionen auslösen können (Bittner et al. 2013).

Des Weiteren wird TREK-1 stark in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen (z.B. präfrontaler Kortex, Hippocampus, Striatum und Amygdala) exprimiert, welche mit kognitiven und emotionalen Dysfunktionen bei Depressionen assoziiert sind. In verschiedenen experimentellen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass in TREK-1^{-/-} Mäusen die serotonerge Neurotransmission erhöht ist und diese resistent gegenüber Depressionen sind (Heurteaux et al. 2006). Fluoxetin (selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer und TREK-1 Inhibitor), Spadin (selektiver TREK-1 Inhibitor) und weitere TREK-1 Blocker sind somit von bedeutendem therapeutischen Interesse für die Behandlung von Depressionen (Kennard et al. 2005; Mazella et al. 2010; Moha ou Maati et al. 2012).

1.4 Das Häm-Hämoxxygenase System

Das Häm-Hämoxxygenase System ist eine übergeordnete Bezeichnung für den stereospezifischen Abbau von Häm zu Biliverdin mit gleichzeitiger Freisetzung von zweiwertigen Eisenionen und Kohlenstoffmonoxid durch die katalytische Aktivität der Enzymgruppe der Hämoxxygenasen. Obwohl Häm für eine Vielzahl von Prozessen im Organismus essentiell ist, wirkt sich ein Überschuss von intra- oder extrazellulärem Häm toxisch aus (Hou et al. 2006). Um die zelluläre Homöostase zu erhalten und Hämtoxizität zu verhindern, existieren deshalb eine Reihe von Regulationsmechanismen (Hou et al. 2006). Neben löslichen Hämbindeproteinen wie Haptoglobin (Hp), Hämopectin (Hx) und Albumin, welche nach Hämbindung als Hämkomplexe durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden, werden auch Häm-Exporter (FLVCR1a und ABGG2) und Häm-Importer (FLVCR2 und HCP1) in den Zellen exprimiert. Darüber hinaus wird die Hämsynthese durch eine negative Feedback-Hemmung und der Hämabbau mittels Hämoxxygenasen stark kontrolliert (Chiabrando et al. 2014).

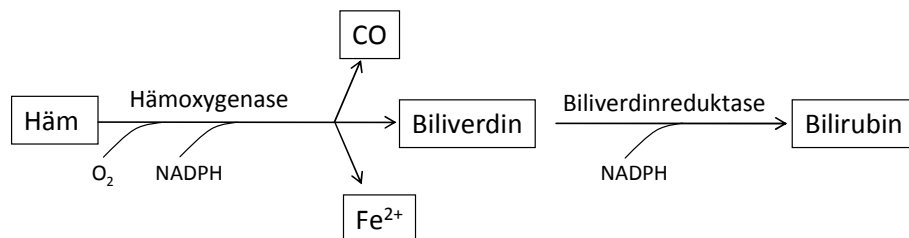


Abb. 1.6 Schematische Darstellung des Häm-Katabolismus

Hämoxxygenasen katalysieren sauerstoff- und NADPH-abhängig den Abbau von Häm. Häm wird zum Gallenfarbstoff Biliverdin oxidiert. Die Spaltung des Porphyrinringes führt zur Freisetzung von Eisenionen (Fe^{2+}) und Kohlenstoffmonoxid (CO). Das entstandene Biliverdin wird durch die NADPH-abhängige Biliverdinreduktase weiter zu Bilirubin reduziert. [vereinfacht nach (Ryter et al. 2006)].

1.4.1 Häm

Häm-Moleküle sind Komplexverbindungen, die aus einem zentralen zweiwertigen Eisenion und einem Protoporphyrin-IX-Ringsystem als Ligand bestehen. Häm wird in den Mitochondrien aller kernhaltigen Zellen des humanen Körpers synthetisiert und ist für viele Prozesse im Körper essentiell. Als Kofaktor im Hämoglobin und Myoglobin ist Häm als Sauerstofftransport-

molekül in Erythrozyten und als Sauerstoffspeicher im Muskel von großer Bedeutung. Weiterhin findet sich Häm in vielen Proteinen als prosthetische Gruppe, wie zum Beispiel in Cytochromen, Oxidasen und Katalasen (Hou et al. 2006). Darüber hinaus wirkt Häm auch als zelluläres Signalmolekül, indem es die Transkription durch Bindung an Transkriptionsfaktoren reguliert und Ionenkanäle (Slo1 BK-Kanal) moduliert (Zhang & Guarente 1995; Ogawa et al. 2001; Tang et al. 2003).

1.4.2 Hämoxygenasen

Das Enzym Hämoxygenase wurde erstmalig von Tenhunen et al. im Jahre 1968 untersucht. Wie bereits beschrieben, katalysiert es den Abbau von Häm zu Biliverdin, Eisenionen und Kohlenstoffmonoxid. Diese Reaktion ist abhängig von Sauerstoff und benötigt die Cytochrom P450 Reduktase und NADPH als Koenzym.

Gegenwärtig sind drei Isoformen des Enzyms bekannt: HO-1, HO-2 und HO-3 (Maines 1997). Die Isoform HO-3 wurde erstmals im Gehirn der Ratte beschrieben (McCoubrey, Huang & Maines 1997) und besitzt nur eine marginale enzymatische Aktivität (Trakshel, Kutty & Maines 1986; Hayashi et al. 2004). Es wird vermutet, dass es sich bei der HO-3, von der zwei Formen (HO-3a und HO-3b) auf mRNA Ebene bekannt sind, um ein Pseudogen handelt (Hayashi et al. 2004).

Die Hämoxygenase-1 (HO-1) weist ein Molekulargewicht von 32 kDa auf und wird in vielen Geweben, besonders in Milz und Leber, exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression des Enzyms sehr schwach, sie kann jedoch durch eine Vielzahl von Reizen induziert werden. Schwermetalle, bakterielle Lipopolysaccharide, Häm, Toxine, Cytokine, Hormone, therapeutische Agentien und Variationen im Zellzustand, wie z.B. Hitzeschock oder andere Formen von zellulärem Stress, führen zu einer erhöhten Expression der HO-1. Weiterhin wird die Genexpression von HO-1 durch Transkriptionsfaktoren und verschiedene Signalkaskaden, wie z.B. über MAP-Kinasen, PKC, PKA, PKG und Phosphatasen, reguliert (Wagener 2003).

Hämoxygenase-2

Die Hämoxygenase-2 (HO-2) hat ein Molekulargewicht von 36 kDa und wird ubiquitär und konstitutiv exprimiert. Sie kommt besonders stark in neuronalen Geweben, Hoden und im Glomus caroticum vor (Wagener 2003; Prabhakar et al. 1995; McCoubrey, Eke & Maines 1995). Im Menschen konnten zwei Transkripte mit einer Größe von 1,3 und 1,7 kb nachgewiesen werden, die durch unterschiedliche Transkriptionsinitiation, alternativen Gebrauch der beiden Poly (A)-Stellen oder alternatives Spleißen entstehen. Die Transkription kann weiterhin durch Opiate, Östrogene und adrenale Glucocorticoide reguliert werden (Liu et al. 2000; Li & Clark 2000; Tschugguel et al. 2001).

Die primäre Proteinstruktur der HO-2 ist in Abb. 1.7 dargestellt. Die katalytische Region im Bereich der Aminosäuren 149-169 bilden die Hämtasche, in welcher die Pyrrolringe 1 und 2 des Häms durch elektrostatische Interaktionen binden. Das konservierte Histidin an Aminosäureposition 151 ist essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms. Die Hämtasche wird durch eine proximale Helix und eine distale Helix gebildet. Besondere Bedeutung in der proximalen Helix besitzt Histidin an Position 45, welches das Häm im katalytischen Zentrum stabilisiert (Abb 1.7) (Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2014).

Die Aktivität der HO-2 wird über hämregulatorische Motive (HRM), welche sich in der Nähe des distalen C-Terminus befinden und zwei Cysteinreste enthalten, sauerstoffabhängig reguliert. Unter physiologischen Bedingungen bilden die Cysteinreste der HRMs eine Disulfidbrücke und die Affinität für Häm an der Hämbindungsstelle ist hoch. Sinkt der Sauerstoffgehalt ab, werden die Disulfidbrücken reduziert und es entstehen Dithiole, wodurch die Affinität für Häm an der Hämbindestelle sinkt. Die HRMs kontrollieren somit die Aktivität der HO-2 durch Regulation der Hämbindung an das Enzym sauerstoffabhängig (Yi et al. 2009; Ishikawa et al. 1998).

Die Aktivität der HO-2 kann auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Durch die Proteinkinase C (PKC)-abhängige Aktivierung der Casein Kinase 2 (CK2) kann HO-2 an Serin an Position 79 phosphoryliert und damit aktiviert werden. Außerdem kann die Aktivität der HO-2 durch die Bindung von Calcium-Calmodulin (Boehning et al. 2003; Boehning et al. 2004; Vukomanovic et al. 2014) und durch Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Menadione (Vitamin K3) erhöht werden.

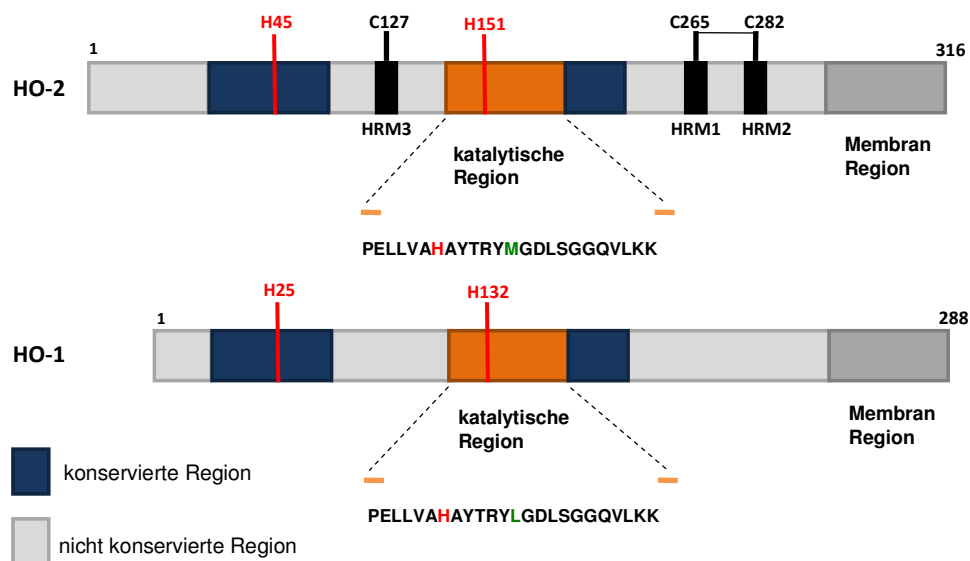


Abb. 1.7 Gegenüberstellung der Primärstruktur von HO-1 und HO-2

Die katalytische Region (orange) mit der für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäure Histidin (rot) in HO-2 an Position H151 und in HO-1 an Position H132. Histidin an Position H25 in HO-1 und Histidin an Position H45 in HO-2 stabilisieren die Hämbindung (rot). HO-2 verfügt zusätzlich über drei hämregulatorische Motive in Form von Cysteinen (C127, C265 und C282) (schwarz). Beide Isoformen sind über den distalen Carboxyterminus in der Membran verankert (dunkelgrau). Konservierte Regionen sind in dunkelblau, nicht konservierte Regionen in hellgrau dargestellt. [nach (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas 2014)].

Aufgrund der Existenz sauerstoffsensitiver Elemente und einer starken Expression im Glomus caroticum wird die HO-2 als universeller Sauerstoffsensordiskutiert (Maines 1997). Weiterhin ist das Enzym ein Interaktionspartner des Calcium-sensitiven BK-Kanals, und es konnte gezeigt werden, dass die HO-2 die Kanalaktivität sauerstoffabhängig reguliert (Williams 2004).

Auch im Herz spielt die HO-2 eine bedeutende Rolle, es wird vermutet, dass eine Interaktion mit dem kardialen Ca^{2+} -Kanal zu einer schnellen Antwort des Kanals auf Hypoxie führt (Rosa et al. 2012).

Untersuchungen an HO-2 Knock-out-Mäusen ($\text{HO-2}^{-/-}$) zeigen, dass die HO-2 auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der endothelialen Zellhomöostase spielt und eine neuroprotektive Funktion nach traumatischen Gehirnverletzungen hat (Bellner et al. 2009; Doré et al. 1999; Yoneyama-Sarnecky et al. 2010).

1.4.3 Produkte: Biliverdin, Fe²⁺ und Kohlenstoffmonoxid

Biliverdin

Biliverdin, ein Abbauprodukt des Hämstoffwechsels, wurde zunächst als ein metabolisches Abfallprodukt mit gesundheitsschädlicher Wirkung angesehen. Biliverdin wird im Körper sehr schnell durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin umgewandelt, welches in hohen Konzentrationen eine Bilirubinzephalopathie im zentralen Nervensystem von Neugeborenen hervorrufen kann (Kappas 2004).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Biliverdin und Bilirubin auch zytoprotektive Eigenschaften besitzen. Sie sind reduzierende Moleküle, demzufolge Antioxidantien, und verhindern oxidativ vermittelte Zellschäden und vermindern oxidativen Stress im Organismus (Kushida et al. 2002; Stocker et al. 1987). Weiterhin haben sie eine antiinflammatorische Wirkung, verhindern endothelialen Zelltod, schützen das kardiovaskuläre System und können der Entstehung von Arteriosklerose entgegenwirken (Sedlak & Snyder 2004; Clark et al. 2000; Ollinger et al. 2007).

Eisen

Ein weiteres Abbauprodukt des Hämstoffwechsels sind Eisenionen, welche in den Oxidationsstufen II und III in biologischen Systemen vorkommen können. Eisen ist als Bestandteil von Enzymen, Hämoglobin und Myoglobin, ein wichtiges Spurenelement und bedeutend für den Sauerstofftransport, die Sauerstoffaufnahme und den Energiestoffwechsel. Unter physiologischen Bedingungen liegt nur ein sehr geringer Anteil als freies Eisen vor, da dieses im Plasma an das Glykoprotein Transferrin gebunden ist, anschließend über Transferrinrezeptoren in intrazelluläre Kompartimente transportiert und intrazellulär im Proteinkomplex Ferritin gespeichert wird (Hentze et al. 2010; Ponka, Beaumont & Richardson 1998). Es ist bekannt, dass eine hohe Konzentration an freiem Eisen eine toxische Wirkung auf den Organismus hat, indem es zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beiträgt und somit zu einer Schädigung von DNA und Proteinen führen kann (Halliwell & Gutteridge 1992). Eine Regulation der intrazellulären Eisenkonzentration ist

somit von großer Bedeutung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Eisen selbst, durch Bindung an eisenregulierende Proteine die Expression von Genen, die am Eisenstoffwechsel beteiligt sind, steuern kann (Hentze & Kühn 1996; Domachowske 1997). Weiterhin kann eine verstärkte Transkription der Hämoxygenase auch zu einer erhöhten Synthese von Ferritin führen (Vile & Tyrrell 1993; Vogt et al. 1995).

Kohlenstoffmonoxid

Kohlenstoffmonoxid (CO), ein farb-, geruch- und geschmackloses, diatomisches Molekül, wurde in der Vergangenheit primär als ein toxisches Gas angesehen (Wilkinson & Kemp 2011). Aufgrund seiner hohen Affinität bindet es ca. 228-fach stärker als Sauerstoff an das zentrale Fe^{2+} im Hämoglobin, und behindert so die Sauerstoffaufnahme und dadurch den Sauerstofftransport im Körper; es kann zum Tod durch Erstickung führen (Allen & Root 1957; Rodkey et al. 1974). Erst in den letzten Jahren wurde bekannt, dass der Körper auch endogen CO produziert. Dabei entstehen ca. 80% des CO durch den von Hämoxygenasen vermittelten Häm-Abbau und ca. 20% durch Photo- und Autooxidation von organischen Molekülen und Peroxidation von Lipiden (Rodgers et al. 1994). Endogenes CO reguliert eine Reihe physiologischer Prozesse und ist ein wichtiges zelluläres Signalmolekül. Durch die Beeinflussung diverser Signalwege ist CO ein wichtiger Regulator von Ionenkanälen (Peers et al. 2014). Zu den CO-sensitiven Ionenkanälen, die durch unterschiedliche CO-abhängige Signalwege inhibiert werden, gehören der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv2.1 (Regulation über ROS und PKG), der kardiale L-Typ Calcium Kanal (via ROS), der epitheliale Natriumkanal ENaC (unbekannter Mechanismus) und die einwärts gleichrichtenden Kanäle Kir2.2 und Kir2.3 (Regulation über veränderte PIP_2 Interaktion) (Althaus et al. 2009; Dallas et al. 2011; Scragg et al. 2008; Liang et al. 2014). Weiterhin wurden Ionenkanäle gefunden, die durch CO direkt oder durch CO-regulierte Signalwege aktiviert werden. Hierzu gehören der Calcium-sensitive Kaliumkanal BK_{Ca} (direkte CO Bindung), der intestinale L-Typ Calciumkanal (durch cGMP und PKA), der ATP-gesteuerte P2X2 Rezeptor (unbekannter Mechanismus) und der TREK-1 Kanal (Jaggar et al. 2005; Telezhkin et al. 2011; Lim 2005; Wilkinson et al. 2009;

Dallas, Scragg & Peers 2008). Es wird vermutet, dass TREK-1 PKG-abhängig durch CO reguliert wird (siehe 1.3.1).

Die Regulation von Ionenkanälen hat Einfluss auf eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. CO ist ebenso wie NO, ein endogener kardiovaskulärer Modulator, der in einer Vielzahl von Geweben zur Vasodilatation führt und in geringen endogenen Mengen kardioprotektiv wirken kann (Musameh et al. 2006; Peers & Steele 2012; Baum et al. 2000; Ndisang, Tabien & Wang 2004; Leffler, Parfenova & Jaggar 2011). Auch im Gehirn spielt CO eine bedeutende Rolle. Es reguliert den circadianen Rhythmus, wirkt antiinflammatorisch, beeinflusst die Neurotransmission durch Modulation von Neurotransmittern und kann zusätzlich auch selbst als Neurotransmitter wirken (Hanafy, Oh & Otterbein 2013; Verma et al. 1993; Otterbein et al. 2003). Weiterhin wird endogenes CO als Regulator der Sauerstoffdetektion in den Karotiden diskutiert (Prabhakar et al. 1995).

1.5 Fragestellung

Der TREK-1 Kanal wird durch eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Stimuli, sowie durch eine Reihe von Interaktionspartnern reguliert. Durch die Beteiligung des Kanals an einer großen Anzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen sind das Auffinden zusätzlicher Interaktionspartner und die Aufklärung weiterer Regulationsmechanismen von großer Bedeutung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Interaktion zwischen dem Enzym Hämoxygenase 2 (HO-2) und dem TREK-1 Kanal weitergehend zu charakterisieren. Zunächst wurde die direkte Interaktion zwischen HO-2 und TREK-1 mit molekularbiologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Methoden genauer untersucht und bestätigt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems eine mögliche Interaktionsdomäne zu identifizieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion mit HO-2 funktionelle Auswirkungen auf den TREK-1 Kanal ausübt. Durch Beeinflussung der katalytischen Aktivität mit Hilfe von Aktivatoren, Inhibitoren und einer katalytisch inaktiven Form des Enzyms sollten die funktionellen Auswirkungen weiter untersucht werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Reaktionsprodukt Kohlenstoffmonoxid (CO), welches beim katalytischen Abbau von Häm durch Hämoxygenasen entsteht. TREK-1 wird durch Zugabe des CO-freisetzenden Moleküls CORM-2 in *Xenopus* Oozyten aktiviert. Mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen in *Xenopus* Oozyten sollte untersucht werden, ob weitere CO-Donatoren und gasförmiges CO auch einen Effekt auf den TREK-1 Kanal haben.

Weiterhin wurde der Signalweg, über den CO einen Effekt auf den TREK-1 Kanal ausübt, mit elektrophysiologischen Messungen in *Xenopus* Oozyten und im humanen Expressionssystem untersucht.

Abschließend wurde getestet, ob weitere K_{2P} -Kanäle und andere Kaliumkanäle ebenfalls durch CO reguliert werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien und Lösungen

Komponente	Hersteller
2x YT Pulver	SERVA
30% Acrylamid 0,8 Bisacrylamid	Carl Roth
Adenin	Sigma
Agarose	Sigma
Acetat	Merck
APS	Merck
BSA	Carl Roth
Bupivacain	Sigma
CaCl ₂	Sigma
CORM-2	Sigma
CORM-S1	AG Prof. Westerhausen, Jena
DMEM	Gibco Invitrogen
DMSO	Sigma
dNTP Mix	Stratagene
Dropout Supplement	Clontech
DTT	Sigma
EGTA	Fluka
Ethanol	Carl Roth
FCS	PAA
GelRed	Phenix Research Products
Glucose	Sigma
Glycin	Sigma
Glycerol	Sigma
H89	Tocris Bioscience
Hämin	Sigma
Hefeextrakt	Sigma
HEPES	Sigma
Hexanucleotide	Roche
K ₂ ATP	Sigma
KCl	Merck
K-Glutamate	Sigma
Lachssperma	Sigma
LiOAc	Sigma
Methanol	Merck

MgCl ₂	Merck
Minimal SD Base	Clontech
Na ₂ GTP	Sigma
NaCl	Carl Roth
Natriumpyruvat	Merck
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
PEG	Aldrich
Rotiblock	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Selektiv Agar	Invitrogen
SNP	Sigma
Super Signal Elisa Femto	Pierce Biotechnology
TEMED	Carl Roth
Theophyllin	Sigma
TPA	Sigma
TRIS	Carl Roth
Triton-X-100	Serva
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	Roth
x-GAL	Roth
YPD Medium	BD Bioscience
ZnPP	Frontier Scientific
ZnCl ₂	Sigma

Ausrüstung

Komplettsysteme (Kits):

Minipräparation:	E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I, Omega bio-tek
Midipräparation:	Plasmid Plus Midi Kit, Qiagen
PCR-Aufreinigung:	PCR Purification Kit, Qiagen
Gelextraktion:	Gel Extraction Kit, Qiagen
cRNA-Synthese:	mMESSAGE mMACHINE T7® Kit, Ambion
Mutagenese:	QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene

DNA-Verdau (Restriktionsenzyme)	
EcoR1	Fast Digest, Fermentas
HindIII	Fast Digest, Fermentas
Apal	Fast Digest, Fermentas
Sall	Fast Digest, Fermentas
NheI	Fast Digest, Fermentas
NcoI	Fast Digest, Fermentas
DpnI	MBI, Fermentas
Sfi	New England Biolabs

Modifizierende Enzyme	
Fast AP(Intestine alkaline Phosphatase)	Fast Digest, Fermentas
T4 Ligase	New England Biolabs

Bakterienstämme:

Chemisch kompetente Zellen des Stamms *Escherichia coli*:

DH5 α [Genotyp: F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*], Invitrogen

BL21-CodonPlus[®]-RIL Competent Cells [Genotyp: *E.coli* B F⁻ *ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal endA* Hte [*argU ile Y leuW* Cam^r], Stratagene

Elektrokompetente Zellen des Stamms *Escherichia coli*:

XL1-Blue [Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*((F'*proAB lacI*^f Δ M15 Tn10 (Tet^r))), Stratagene

Hefestämme:

Saccharomyces cerevisiae:

NMY51 [Genotyp: MATa; *his3* Δ 200; *trp1*-901; *leu2*-3,112; *ade2*; LYS2:(*lexAop*)4-HIS3; URA3:(*lexAop*)8-lacZ; *ade2*:(*lexAop*)8-ADE2; GAL4], Mobitec

Antibiotika:

Zur Selektion der Bakterien:	Ampicillin und Kanamycin, Sigma
Zur Behandlung der Zellkulturen:	Penicillin und Streptomycin, PAA
Zur Behandlung der Oozyten:	Gentamycin, Sigma

Zelllinien:

Für Proteingewinnung nach transienter Transfektion: HeLa-Zellen

Für Patch-Clamp Messungen nach transienter Transfektion: HEK293-Zellen

Für Fluoreszenzuntersuchungen: COS-7 Zellen

Transfektionsreagenzien:

jetPRIME, Polyplus

Längenstandardmarker:

DNA-Marker: λ DNA Eco471 13, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Ava II

Proteinmarker bei SDS-PAGE: PageRuler[®] Protein Ladder, Fermentas

Antikörper:Oberflächenexpressionsassay:

Primärantikörper: anti-HA # 1867423, rat monoclonal, Roche

Sekundärantikörper: Anti-rat IgG Peroxidase konjugiert,
Jackson ImmunoResearch

Westernblots:

Primärantikörper: Anti-GFP ab290, rabbit polyclonal, Abcam

Primärantikörper: Anti-hHMOX-2 (H73), rabbit polyclonal, sc 11361,
Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper: Anti-rabbit IR Dye 680 polyclonal, LI-COR

Oligonukleotidprimer:**Primer für qualitative PCR**

cDNA	Name des Primers	Sequenz in 5'- 3' Richtung
xHO-2 (Fragmentlänge: 197 bp)	xHMOX-2-for	GGACTGTATGGTACAGAGGAAG
	xHMOX-2-rev	CTCCTCCAGAGCAGAGTAAGTG
xGAPDH (Fragmentlänge: 240 bp)	xGAPDH-for	CTTTGGCATTGTTGAGGGACTC
	xGAPDH-rev	GCAGGTCAGATCCACGACGGAC

Primer für Mutagenese

cDNA	Name des Primers	Sequenz in 5'- 3' Richtung
hTREK1c-S362A	hTREK1c-S362A-for	CAAGCGGAAGCTCGCGGCAGAAC TG
	hTREK1c-S362A-rev	CCAGTTCTGCCGCGAGCTTCCGCT TG
hTREK1c-S362D	hTREK1c-S362D-for	CAAGCGGAAGCTCGACGCAGAAC TGGC
	hTREK1c-S362D-rev	GCCAGTTCTGCGTCGAGCTTCCGC TTG
hTREK1c-S344A	hTREK1c-S344A-for	CAGGAGGCGACTGGCTGTGGAGA TTTAT
	hTREK1c-S344A-rev	ATAAATCTCCACAGCCAGTCGCCT CCTG
hTREK1c-S344D	hTREK1c-S344D-for	CCAGGAGGCGACTGGATGTGGAG ATTTATG
	hTREK1c-S344D-rev	CATAAATCTCCACATCCAGTCGCC TCCTGG
hTREK1c-C376S	hTREK1c-C376S-for	GAGCTGACTCCTTCTAGGAGGACC CTG
	hTREK1c-C376S-rev	CAGGGTCCTCCTAGAAGGAGTCAG CTC
hTREK1c-C410S	hTREK1c-C410S-for	GTTTGACGCCCACTCTGCTGGTG AAGAG
	hTREK1c-C410S-rev	CTCTTCACCAGCAGAGTGTGGCGT CAAAC
hTREK1c-C170A	hTREK1c-C170A-for	GGCAAAATATTCGCTATCATCTATG C
	hTREK1c-C170A-rev	GCATAGATGATAGCGAATATTTTG CC
hTREK1c-C104A	hTREK1c-C104A-for	CCCAACATTCCGCTGTCAATTCGA CG
	hTREK1c-C104A-rev	CGTCGAATTGACAGCGGAATGTTG GG
hTREK1c-C230A	hTREK1c-C230A-for	CTATTTGGCGCTGTACTCTTTGTG GC

	hTREK1c-C230A-rev	GCCACAAAGAGTACAGCGCCAAATAG
hTREK1c-A334* (TREK-1 Δ CT)	hTREK1c-A334*-for	CAACGTCACATGAGATTCAAAGAAAC
	hTREK1c-A334*-rev	GTTTCTTTGAATTCTCATGTGACGTG
hTREK1c-I303*	hTREK1c-I303*-for	GTCCTGAGCATGTGAGGAGATTGGCTC
	hTREK1c-I303*-rev	GAGCCAATCTCCTCACATGGCTCAGGAC
hTREK-1c-M1,2l-short (TREK-1 Δ NT)	hTREK1c-M1,2l-short-for	CATCACCAAATCATCAACCCACGAGCAAAAAG
	hTREK1c-M1,2l-short-rev	CTTTTTGCTCGTGGGTTGATGATTTGGTGATG
hHO-2-H45N	hHO-2-H45N-for	AGGGACCAAGGAAGCAAACGACCGGGCAGAAAACAC
	hHO-2-H45N-rev	GTGTTTTCTGCCCGGTCGTTTGCTTCCTTGGTCCCT

PCR-Primer für Klonierungen

cDNA	Name des Primers	Sequenz in 5'- 3' Richtung
hHO-2-M1 (Klonierung in pSGEM)	hHMOX-2-EcoRI-FL-For	CACACCGAATTCCAATGTCAGCGGAAGTG
	hHMOX-2-HindIII-FL-pSGEM-Rev	TCGATAAGCTTGCTTCACATGTAGTACCAG
hHO-2-M231 (Δ 1-230) (Klonierung in pSGEM)	hHMOX-2-EcoRI-M231-For	GCTTTTGAATTCAACATGCAGATATCAATGAAC
	hHMOX-2-HindIII-FL-pSGEM-Rev	TCGATAAGCTTGCTTCACATGTAGTACCAG
hHO-2-M288 (Δ 1-287) (Klonierung in pSGEM)	hHMOX-2-M288-EcoRI-For	CTTCCGAATTCCAATGGCTGTGCTGAGGAAGC
	hHMOX-2-HindIII-FL-pSGEM-Rev	TCGATAAGCTTGCTTCACATGTAGTACCAG
hHO-2-M1 (Klonierung in pPR3N)	hHMOX-2-Sfil-M1-For	GGCGGCCATTACGGCCATGTCAGCGGAAGTGGAAAC
	hHMOX-2-Sfil-FL-Rev-neu	CGAGGCCGAGGCGGCCGATAAGCTTGCTTCACATG
hHO-2-M231 (Δ 1-230) (Klonierung in pPR3N)	hHMOX-2-Sfil-M231-For	GGCGGCCATTACGGCCATGCAGATATTCAATGAACTG
	hHMOX-2-Sfil-FL-Rev-neu	CGAGGCCGAGGCGGCCGATAAGCTTGCTTCACATG
hHO-2-M288 (Δ 1-287) (Klonierung in pPR3N)	hHMOX-2-Sfil-M288-For	CCGGCCATTACGGCCATGGCTGTGCTGAGGAAGCCCAG
	hHMOX-2-Sfil-FL-Rev-neu	CGAGGCCGAGGCGGCCGATAAGCTTGCTTCACATG

Geräte:

Brutschrank:	FunctionLife, Heraeus
Digital-Analog-Umwandler:	PCI-6014
Energiequellen:	Electrophoresis Power Supply EPS 200, Pharmacia Biotech
Glaskapillaren (Injektion):	3,5 Drummond Replacement Tubes, Drummond Scientific Company
Glaskapillaren (Messung): (TEVC; Patch-Clamp) (Giant-Patch)	GB150TF-8P 1,05x1,50x80mm, SCIENCE PRODUCTS 1405020, 75x2x0,5mm, Hilgenberg
Heizblock:	Thermomixer 5436, Eppendorf
Infrarot Imaging-System:	Odyssey Sa, LI-COR
Kamera:	Chromaphor, DVC
Luminometer:	Glomax 20/20 Luminometer, Promega
Mikroinjektor:	Nanoject II, Drummond Scientific Company
Mikropipettenpuller:	DMZ-Universal Puller, Zeitz
Mikroskop:	Leica WILD M3C
Scanner:	1640SU, EpsonPerfection
Sterilbank:	Heraeus
Schüttler:	Cellstar, IntermedNunc, 3005, GFL
Spektralphotometer:	SmartSpec® 3000, Biorad NanoDrop, Thermo Scientific
Thermocycler:	MJ Mini, Biorad
Pumpe:	Institutswerkstatt
Verstärker: (TEVC) (Patch-Clamp) (Giant-Patch)	Turbo TEC-05X, npi Electronic Instruments Axopatch 200B Patch-Clamp, Axon instruments HEKA, Lamprecht
Zellinkubator:	Hera Cell 240, Heraeus
Zentrifuge:	Biofugefresco, Heraeus Biofuge 28 RS, Thermo scientific

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA in Bakterien wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen des Stammes DH5 α und elektrisch kompetente XL1-Blue Zellen verwendet. Bei der Verwendung chemisch kompetenter DH5 α Zellen wurden diese zunächst schonend auf Eis aufgetaut, danach wurde Plasmid-DNA zugegeben und der gesamte Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock von 40 s bei 37°C ausgesetzt und erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C geschüttelt, um die Vermehrung der Bakterien zu ermöglichen. Die transformierten Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2376 g für 5 min pelletiert, der Großteil des Medienüberstands verworfen und das Bakterienpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf LB-Agarplatten, mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die elektrokompenten XL1-Blue Zellen wurden ebenfalls schonend auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA versetzt und danach in eine Küvette überführt. Anschließend wurde mittels einer Stromquelle ein Stromstoß appliziert. Danach wurden 900 μ L LB-Medium hinzugegeben und die Zellen für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2376 g für 5 min wurde die Suspension auf LB-Agarplatten, mit dem jeweiligen Antibiotikum, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

LB-Medium (Roth)	
Komponente	Konzentration
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L

2.2.2 Plasmidisolierung aus Bakterien

Minipräparation

Mittels einer Pipettenspitze wurden einzelne Bakterienklone von einer LB-Agarplatte gepickt und in 2,5 mL LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kulturen für 1 min bei 16060 g pelletiert. Mit Hilfe des „E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I“ wurde nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA isoliert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 100 µL autoklaviertem H₂O eluiert und die Konzentration der DNA bei 260 nm photometrisch bestimmt (siehe 2.2.3). Um zu überprüfen, ob das zu klonierte DNA-Fragment im Plasmid enthalten ist, wurde ein Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen angesetzt und nach angemessener Inkubationszeit zur Größenauftrennung auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.2.4).

Midipräparation

Zur Midipräparation wurde ein einzelner Bakterienklon in 50 mL LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum, über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation bei 2669 g für 15 min wurden die Bakterien pelletiert und mit Hilfe des „CompactPrep Plasmid Midi Kit“ nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Die DNA-Konzentration wurde ebenfalls photometrisch bestimmt (siehe 2.2.3).

2.2.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung im NanoDrop

Zur Bestimmung der Konzentration und Überprüfung der Reinheit von DNA und RNA wurde ein NanoDrop-Gerät (Thermo Scientific) verwendet. Dazu wurde 1 µL der Probe direkt auf die Detektionsoberfläche des Gerätes pipettiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm gemessen. Der Konzentrationsbestimmung liegt folgende Formel zugrunde:

RNA-Konzentration (ng/µL) = $OD_{260} \cdot 40$ ng/µL (Faktor für RNA)

DNA-Konzentration (ng/µL) = $OD_{260} \cdot 50$ ng/µL (Faktor für DNA)

Um Reinheit der Nukleinsäuren zu überprüfen, wurde der Reinheitskoeffizient bestimmt, der sich aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ergibt und zwischen 1,7-2 liegen sollte.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA bzw. RNA wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurde 1,5 g Agarosepulver (Sigma) in 100 mL TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Anschließend wurde 5 µL GelRed (1:10000 in H₂O verdünnt) in die gelöste Agarose gegeben und in den vorbereiteten Gelkammern verteilt. GelRed interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert unter UV-Licht rot. Nach Abkühlen und Verfestigen unter dem Laborabzug wurden die Gele bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Beim Beladen der Gele wurden die DNA- bzw. RNA-Proben mit 4 µL Gel-Ladepuffer versetzt und danach in die Geltasche pipettiert. Zur Abschätzung der Größe wurden 8 µL eines DNA-Marker (Lambda DNA/Eco471 (Ava II) Marker, 13; Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte in einer mit 1x TAE-Puffer befüllten Agarose-Gelelektrophoresekammer für 30 min bei 80 V und 400 mA. Zur Auswertung und Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und anschließend gespeichert.

Gel-Ladepuffer	
Komponente	Konzentration
Bromphenolblau	0,2% (v/v)
Xylencyanol FF	0,25% (v/v)
Glycerin	30% (v/v)

TAE-Puffer (50x)	
Komponente	Konzentration
TRIS	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 mit NaOH einstellen	

2.2.5 DNA Sequenzierung

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma SEQLAB durchgeführt. Die Auswertung der Sequenz wurde mit Hilfe computergestützter Programme (DNASTAR) durchgeführt.

Sequenzierungsansatz	
Komponente	Menge/Volumen
Plasmid-DNA	1,2 µg
Primer	30 pmol
Gesamtvolumen	15 µL

2.2.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde zum zielgerichteten Verändern von Dann-Sequenzen genutzt. Für die Deletion, Insertion oder Substitution von Desoxynukleotiden im DNA-Strang wurde das „QuikChange Site-DirectedMutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden folgende Komponenten angesetzt:

PCR (Reaktionsansatz für eine Reaktion)	
Komponente	Volumen
Vorwärts-Primer (10pmol/µL)	0,45 µL
Rückwärts-Primer (10pmol/µL)	0,45 µL
DMSO	1,5 µL
dNTP-Mix (10mM)	0,3 µL
10x Reaktionspuffer	1,5 µL
Turbo-Pfu	0,3 µL
Plasmid-DNA	0,6 µL
H ₂ O	9,9 µL
Gesamt	15 µL

Zur Einführung einer Mutation wurden komplementäre Primerpaare eingesetzt, welche die gewünschte Mutation in der DNA enthielten. Die Primer wurden dabei so konzipiert, dass sie rechts und links von der Mutationsstelle mit mindestens 12 Basenpaaren des komplementären DNA-Stranges überlappten. Mit Hilfe der Turbo Pfu Polymerase wurde das gewünschte Konstrukt vervielfältigt.

Thermocyclereinstellung			
	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung der Polymerase	1	96 °C	30 s
Denaturierung	18	96 °C	30 s
Primer Anlagerung		55 °C	1 min
Elongation		68 °C	18 min
Endelongation	1	68 °C	2 min
Kühlung		4 °C	∞

Nach Beendigung der PCR wurde der gesamte Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C mit 1 µL des Restriktionsenzym DpnI (10 U/µL) verdaut, um die methylierte doppelsträngige DNA (dsDNA), welche als Matrize diente, zu entfernen.

Als Kontrolle wurden 2 µL des PCR-Produktes mit 2,5 µL Ladepuffer und 5 µL Wasser versetzt und auf ein 1,5-%iges Agarosegel aufgetragen. Um die Größe der Amplifikate abschätzen zu können, wurde ein Längenstandard aufgetragen.

2.2.7 PCR-Aufreinigung der DNA

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde die DNA mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.8 Agarosegelextraktion

Die DNA-Proben wurden mit 3 µL Ladepuffer versetzt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (siehe 2.2.4). Für die Gelextraktion wurde das Fragment der entsprechenden Größe aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben.

2.2.9 DNA Verdau und Ligation

Der Verdau von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dazu wurden „Fast Digest“ Restriktionsenzyme genutzt. Der Verdau wurde bei 37 °C für 30 Minuten durchgeführt. Bei Verwendung des Restriktionsenzym Sfi der Firma New England Biolabs wurde die Probe bei 50 °C für 120 min verdaut. Vorbereitete Vektoren, die zur Ligation eingesetzt wurden, mussten zusätzlich

mit intestinaler alkalischer Phosphatase aus dem Kalb behandelt werden, um eine Eigenligation der Vektoren zu verhindern.

Hierfür wurde die Probe zunächst für 20 min bei 37 °C mit dem Enzym „Fast AP“ (1 U/μL, Fermentas) inkubiert und anschließend das Enzym für 5 min bei 75 °C inaktiviert.

Ansatz für Restriktionsverdau mit Fast Digest Enzymen	
Komponente	Volumen
DNA	x μL
10x Fast Digest Restriktionspuffer	1 μL
Restriktionsenzym	1 μL
H ₂ O	x μL
Gesamt	10 μL

Ansatz für Restriktionsverdau mit Sfi	
Komponente	Volumen
DNA	x μL
10x Restriktionspuffer 2	1 μL
10x BSA	1 μL
Restriktionsenzym Sfi	1 μL
H ₂ O	x μL
Gesamt	10 μL

Die Ligation wurde unter Verwendung der „T4 DNA Ligase“ (4x10⁵ U/μL, New England Biolabs) durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend in Bakterienzellen transformiert (siehe 2.2.1).

Ansatz für Ligation	
Komponente	Volumen
DNA	6 μL
Vektor	2 μL
10x Ligasepuffer	1 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
Gesamt	10 μL

2.2.10 cRNA Synthese

Um Proteine in *Xenopus* Oozyten exprimieren zu können ist es notwendig, die kodierende Sequenz in Form von cRNA zu injizieren. Diese wurde mittels mMESSAGE mMACHINE T7 Kit hergestellt.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Gene in einen speziellen Oozyten Expressionsvektor kloniert (pSGEM), welcher eine RNA-Polymerase-Bindestelle (T7) vor der klonierten cDNA-Sequenz enthält. Danach wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym Nhe-1 linearisiert und mittels PCR-Purification Kit aufgereinigt. Die *in vitro*-Transkription erfolgte nach Herstellerangaben.

Ansatz für <i>in vitro</i>-Transkription	
Komponente	Volumen
DNA (linearisierter Vektor)	4,5 µL
2x NTP/Cap	7,5 µL
10x Reaktionspuffer	1,5 µL
Enzym Mix	1,5 µL
Gesamt	15 µL

Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurde zunächst die Qualität der cRNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde die synthetisierte cRNA mit Hilfe einer Lithium-Chlorid-Präzipitation präzipitiert. Dazu wurden 19 µL LiCl und 23 µL RNAase-freies H₂O zum gesamten Ansatz hinzugefügt, für 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 16060 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 80%igem Ethanol versetzt und erneut 20 min bei 16060 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol vollständig entfernt und das Pellet für 5 min bei 37°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µL RNAase-freiem H₂O resuspendiert. Mittels Agarosegelelektrophorese wurde die Qualität der cRNA überprüft und die Konzentration spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Injektion von cRNA in *Xenopus* Oozyten

Die Injektion der cRNA in *Xenopus* Oozyten erfolgte mit Hilfe von Glaskapillaren, die mit einem Mikropipettenpuller zu Mikropipetten gezogen wurden, welche einen einheitlichen Durchmesser von 8-10 μm aufwiesen. Die zu injizierende cRNA wurde nach entsprechenden Konzentrationsverhältnissen gemischt, welche sich aus Erfahrungswerten und Versuchsreihen ergaben.

An einem Injektionsplatz, bestehend aus einem Mikroskop, einem Mikroinjektor und einem Mikromanipulator, wurde die cRNA in eine Mikropipette aufgesogen und durch einen definierten Injektionsschub von 50 nL in jede Oozyte injiziert. Nach der Injektion wurden die Oozyten bei 18°C für 48 Stunden in ND 96 Aufbewahrungslösung geschwenkt.

ND 96 Lösung (10x)	
Komponente	Konzentration/Volumen
NaCl	960 mM
KCl	20 mM
CaCl ₂	18 mM
MgCl ₂	10 mM
HEPES	50 mM
H ₂ O	1 L
pH 7,4 mit NaOH einstellen	

Aufbewahrungslösung	
Komponente	Konzentration/Volumen
ND 96 Lösung (1x)	1 L
Natrium-Pyruvat	2,5 mM
Theophyllin	90 mg/L
Gentamycin	20 $\mu\text{g/L}$
pH 7,4 mit NaOH einstellen	

2.3.2 Voltage-Clamp Messungen in *Xenopus* Oozyten

Die mit cRNA injizierten *Xenopus* Oozyten wurden nach entsprechender Inkubationszeit mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch charakterisiert. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden an einem Messplatz, bestehend aus einem Mikroskop, einer Perfusionskammer mit Perfusionssystem und Referenzelektroden, einem Verstärker mit Messelektroden, einem Analog/Digital Wandler und einem PC mit einer LabView basierenden Software, durchgeführt. Als Messelektroden wurden Glaskapillaren verwendet, die mit Hilfe eines Mikropipettenpullers gezogen und mit 3 M KCL-Lösung befüllt wurden. Zu Beginn wurde eine Oozyte in eine mit ND96 Lösung (1x) perfundierte Kammer überführt. Danach wurden die beiden Messelektroden mit einem Widerstand von 0,5-1 M Ω an die Oozytenmembran herangefahren und durch vorsichtiges Antippen in die Oozyte eingestochen. Das Haltepotential wurde auf -80 mV gehalten und anschließend wurde eine Spannungsrampe verwendet (Abb. 2.1). Der Stromverlauf wurde über die Zeit aufgezeichnet und die resultierenden Auswärtsströme bei jeweils 0 mV ausgewertet.

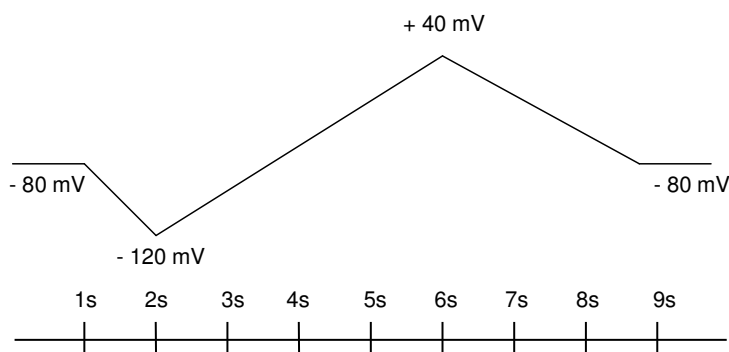


Abb. 2.1 Spannungsprotokoll zur Strommessung von TREK Kanälen in Voltage-Clamp Messungen

2.3.3 Giant-Patch Messungen in *Xenopus* Oozyten

Die injizierten *Xenopus* Oozyten wurden zunächst für 10 min in einer hypertonischen 200 mM Kaliumaspartat-Lösung inkubiert, um durch osmotisch bedingtes Schrumpfen die Vitellinschicht von der Zellmembran zu lösen. Dies ist notwendig, da bei Vorhandensein der Vitellinschicht die Ausbildung eines Gigaohm-seals nicht möglich ist. Die Vitellinschicht, welche durch einen charakteristischen Glanz bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Binokulars sichtbar gemacht wurde, konnte mit zwei angeschliffenen Pinzetten durch vorsichtiges Einreißen und anschließendes Abziehen entfernt werden. Danach wurde die Oozyte 10 min in eine mit Badlösung gefüllte Messkammer überführt, um eine gute Anhaftung an die Messkammer zu erreichen. In der Inkubationszeit wurden die Patch-Pipetten aus Borosilicatglaskapillaren mit Hilfe eines Mikropipettenpullers gezogen und anschließend die Pipettenspitze mit Hilfe eines Heizdrahts angeschmolzen. Danach wurde die Patch-Pipette mit Pipettenlösung befüllt, die Pipettenspitze in Mineralöl getaucht und in den Pipettenhalter eingesetzt. Bevor die Pipette in die Badlösung getaucht wurde, wurde ein leichter Überdruck angelegt, um eine Verunreinigung der Pipette zu vermeiden. Nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung erfolgte ein Abgleich auftretender Potentialdifferenzen zwischen Mess- und Referenzelektrode auf Null. Danach wurde die Pipette, die einen Pipettenwiderstand zwischen 0,3-0,9 M Ω aufwies, langsam an die Oozytenmembran gefahren. Nach dem Aufsetzen der Pipette an der Membran wurde sofort der Überdruck entfernt, so dass die Oozytenmembran leicht an die Pipette gezogen wurde. Innerhalb von 30 s bis zu 3 min bildete sich ein Abdichtwiderstand von mindestens einem Gigaohm. Nach Ausbildung eines Gigaseals wurde die Pipette kurz tiefer in die Oozytenmembran gefahren und anschließend schnell zurückgezogen, um ein sauberes Herausreißen des Membranflecks zu erreichen. Das Haltepotential wurde auf -20 mV gehalten und anschließend wurde eine Spannungsrampe verwendet (Abb. 2.2). Danach wurde die Patchpipette mit dem *inside-out-Patch* vor das Applikationssystem gefahren, um schnelle Lösungswechsel am Patch durchführen zu können. Während des Lösungswechsels wurde der Stromverlauf über die Zeit aufgezeichnet und bei jeweils 0 mV ausgewertet.

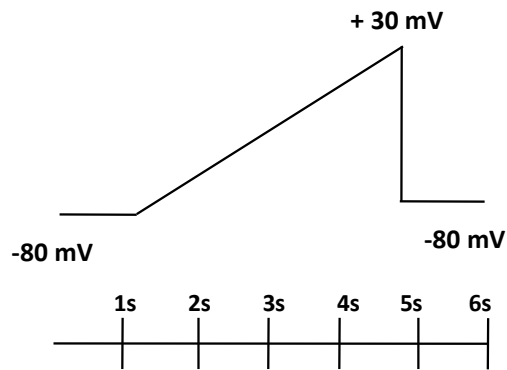


Abb. 2.2 Spannungsprotokoll zur Strommessung von TREK-1 Kanälen in Giant-Patches

Badlösung	
Komponente	Konzentration/Volumen
KCl	120 mM
EGTA	1 mM
HEPES	10 mM
MgCl ₂	1 mM
H ₂ O	1 L
pH 7,4 mit KOH einstellen	

Pipettenlösung	
Komponente	Konzentration/Volumen
NaCl	115 mM
KCl	5 mM
HEPES	10 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,5 mM
H ₂ O	1 L
pH 7,4 mit NaOH einstellen	

2.3.4 Patch-Clamp Messungen in HEK293 Zellen

Zur Messung von TREK-1 Strömen in transfizierten HEK293 Zellen wurde die Patch-Clamp Technik angewandt, welche in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt wurde. Die HEK293 Zellen wurden mit TREK-1c-pcDNA3.1 und einem pEGFP-Leervektor co-transfiziert, um transfizierte von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ wurden die Zellen für Patch-Clamp Messungen genutzt (siehe 2.7). Zunächst wurden Patch-Pipetten aus

Borosilicatglas mit Hilfe eines Mikropipettenpullers gezogen, mit Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Bevor die Pipette in die Badlösung gefahren wurde, wurde ein leichter Unterdruck angelegt, um eine Verunreinigung zu verhindern. Nach dem Eintauchen in die Badlösung erfolgte ein Abgleich auftretender Potentialdifferenzen zwischen Mess- und Referenzelektrode auf Null. Danach wurde die Pipette, die einen Pipettenwiderstand zwischen 3-6 M Ω aufwies, langsam an die Zellmembran gefahren. Nach dem Aufsetzen der Pipette an der Membran wurde der Überdruck entfernt und es bildete sich ein Abdichtwiderstand im Gigaohm Bereich aus (Gigaseal). Man befindet sich nun in der *Cell-attached* Konfiguration, mit der es möglich ist, nur die Ströme von Ionenkanälen zu messen, welche sich unter der Pipette befinden. Um einen Zugang zur gesamten Zelle zu bekommen, wurde ein Unterdruck angelegt. Damit wurde der Membranfleck (Patch) geöffnet und in die *whole-cell* Konfiguration gewechselt. Anschließend wurde das Membranpotential auf -80 mV gehalten und eine Spannungsrampe genutzt (Abb. 2.4). Die resultierenden Ströme wurden mit einem Axopatch 200B (Patch-Clamp Verstärker) verstärkt und mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer LabView basierenden Software. Die Patch-Clamp Messungen wurden von Dr. Julia Schiekel durchgeführt.

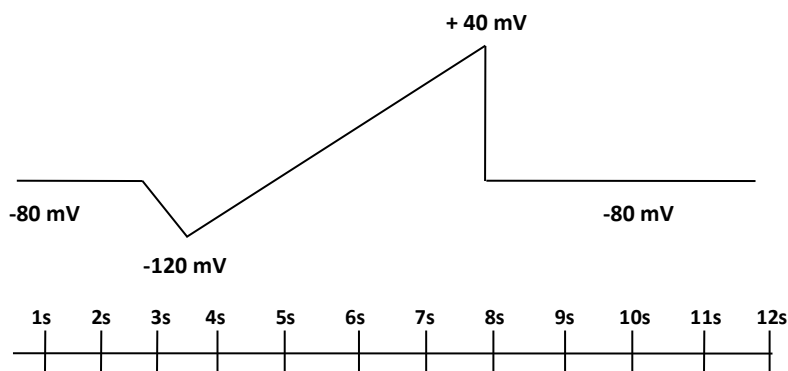


Abb. 2.3 Spannungsprotokoll für Patch-Clamp Messungen von TREK-1 in HEK293 Zellen

Badlösung	
Komponente	Konzentration/Volumen
NaCl	135 mM
KCl	5 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Na-Pyruvat	2 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
H ₂ O	1 L
pH 7,4 mit NaOH einstellen	

Pipettenlösung	
Komponente	Konzentration/Volumen
KCl	60 mM
K-Glutamat	65 mM
EGTA	5 mM
MgCl ₂	3,5 mM
CaCl ₂	2 mM
K ₂ ATP	3 mM
Na ₂ GTP	0,2 mM
HEPES	5 mM
H ₂ O	1 L
pH 7,4 mit KOH einstellen	

2.3.5 Verwendung von CO und NO in elektrophysiologischen Messungen

CO-freisetzende Moleküle (CORMS):

CORMs sind metallorganische Carbonylkomplexe, bei denen CO an ein Übergangsmetallatom in einer niedrigen Oxidationsstufe gebunden ist.

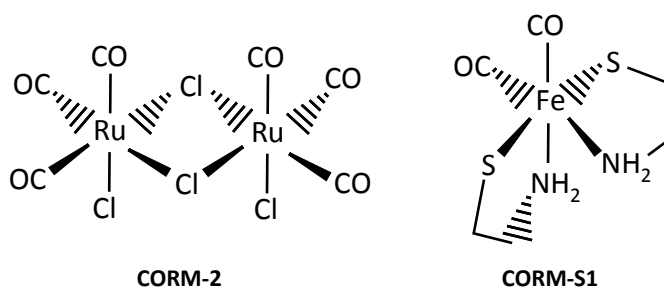


Abb. 2.4 Strukturformel der CO-freisetzenden Moleküle CORM-2 und CORM-S1

CORM-2

Die Substanz CORM-2 wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. CORM-2 wurde in DMSO in einer Konzentration von 30 mM als Stocklösung angesetzt, 1:1000 in ND96 Messlösung verdünnt (für jede Messung frisch) und in einer Endkonzentration von 30 μ M eingesetzt. Die Stocklösung wurde alle 2 h erneuert.

Als Kontrollsubstanz wurde inaktives CORM-2 verwendet. Hierzu wurde die CORM-2 Stocklösung für mindestens 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das inaktive CORM-2 ebenfalls 1:1000 in ND96 Messlösung verdünnt und in einer Endkonzentration von 30 μ M eingesetzt.

CORM-S1

CORM-S1 wurde uns von Astrid Malasa (AG Prof. Dr. Westerhausen, Jena) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die Substanz unter Verwendung einer stickstoffbegasten *GloveBox* unter Lichtausschluss als 50 mM Stocklösung in DMSO gelöst und bei -80 °C gelagert. Die Stocklösung wurde unter Lichtausschluss 1:1000 in ND96 Messlösung verdünnt und in einer Endkonzentration von 50 μ M eingesetzt. Die lichtabhängige CO Freisetzung aus CORM-S1 wurde durch Bestrahlung der Lösung mit einer Lichtquelle (XLamp® XP-E, blaue LEDs, Wellenlänge von 470 nm, der Firma CREE) erzielt.

Als Kontrollsubstanz wurde inaktives CORM-S1 verwendet. Hierzu wurde die CORM-S1 Stocklösung für 48–72 h bei Raumtemperatur und unter Bestrahlung von Licht inkubiert. Anschließend wurde das inaktive CORM-S1 ebenfalls 1:1000 in ND96 Messlösung verdünnt und in einer Endkonzentration von 50 μ M eingesetzt.

CO-Gas

CO-Gas wurde in Form einer 10 L Gasflasche von der Firma Praxair bezogen. Zunächst wurde die ND96 Messlösung auf Eis für 1-1,5 h unter positivem Druck mit 100% CO begast. Anschließend wurde die Lösung weiterhin begast und auf Raumtemperatur gebracht, bevor sie in die Messkammer appliziert wurde.

Die Lagerung und alle Arbeiten mit CO-Gas wurden aus Sicherheitsgründen unter dem Laborabzug durchgeführt. Weiterhin wurde ein CO-Warngerät der Firma Dräger verwendet, um die CO-Konzentrationen außerhalb des Abzugs zu überwachen.

NO-Donator

In allen elektrophysiologischen Messungen mit Stickstoffmonoxid wurde als NO-Donator ein Gemisch aus Sodiumnitroprussid (SNP) und Dithiolthreitol (DTT) verwendet. Zunächst wurden Stocklösungen hergestellt. SNP wurde in einer Konzentration von 2 mM und DTT in einer Konzentration von 4 mM in ND96 gelöst. Anschließend wurden die Stocklösungen 1:1 gemischt und für 30-40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gemischte Lösung (SNP 1 mM, DTT 2 mM) wurde alle 2 h frisch hergestellt.

2.4 Oberflächenexpressionsanalyse in *Xenopus* Oozyten

Um die Oberflächenexpression von Kanalproteinen zu untersuchen, wurden diese mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop markiert. Das HA-Epitop wurde im humanem TREK-1c an Aminosäureposition 277 eingeführt, welches somit auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran präsentiert und durch Chemilumineszenzverfahren nachgewiesen werden konnte. Die jeweiligen Konstrukte wurden in *Xenopus* Oozyten injiziert (siehe 2.3.1) und in ND96 Aufbewahrungslösung für 48 h bei 18°C geschwenkt. Zunächst wurden die Oozyten 30 min bei 4°C in Blocklösung (1% bovines Serumalbumin (BSA) in 1x ND96) inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden die Oozyten für 1 h in 1 µg/mL monoklonalem anti-HA Antikörper der Ratte (Roche) in 1% BSA/ND96 bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Oozyten in Siebe (70 µm Nylon, BD Biosciences) überführt und sechsmal für je 10 min in 1% BSA/ND96 auf Eis gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit 2 µg/mL Peroxidase-konjugiertem Antikörper (anti-Ratte) gelöst in 1% BSA/ND96 bei 4°C. Danach wurden die Oozyten in sechs Waschschritten mit 1% BSA/ND96 für jeweils 10 min gewaschen. Abschließend wurde das BSA in sechs Waschschritten mit 1x ND96 Lösung für jeweils 5 min entfernt. Unmittelbar vor

der Messung wurden die Oozyten einzeln in Reaktionsgefäße mit 20 μ L Substrat (SuperSignal Elisa Femto) Lösung überführt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase kann das im Substrat enthaltene Luminol umsetzen. Bei dieser Reaktion entsteht Chemilumineszenz, die mit dem Luminometer als relative Lichteinheit pro Sekunde (RLU/s) gemessen wurde.

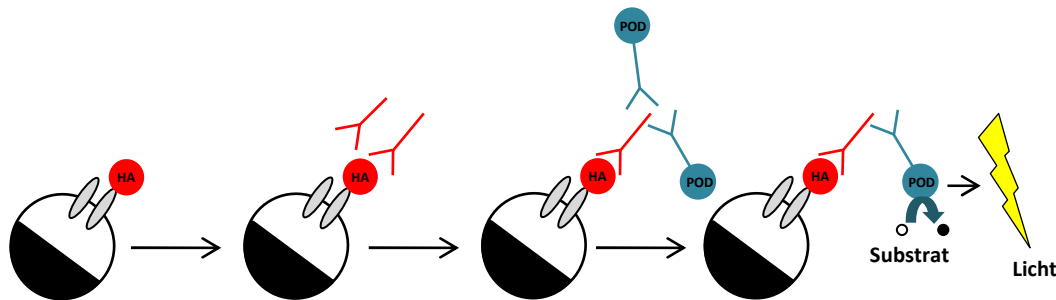


Abb. 2.5 Assay zur Quantifizierung der Oberflächenexpression in *Xenopus* Oozyten – Schematische Darstellung

Xenopus Oozyten wurden mit cRNA eines extrazellulär mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop (rot) markierten Kanals (grau) injiziert. Das HA-Epitop wurde von anti-HA Antikörpern (rot) erkannt. Als Sekundärantikörper wurden Peroxidase-konjugierte anti-Maus Antikörper (blau) verwendet. Bei Zugabe des Substrates Luminol wurde dieses durch die Peroxidase umgesetzt. Bei der Reaktion wird Licht frei, welches mit Hilfe des Luminometers in RLU/s gemessen wird.

2.5 Statistik

Datensätze wurden mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests untersucht. Durch einen t-Test kann überprüft werden, ob sich die Mittelwerte zweier Datensätze statistisch signifikant unterscheiden. Dabei wurde der p-Wert als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit ermittelt. Der p-Wert nimmt mit steigender Signifikanz einen kleineren Wert an, d.h. Werte von $p < 0,05$ galten als signifikant unterschiedlich und wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Werte von $p < 0,01$ wurden mit zwei Sternen (**) und Werte von $p < 0,001$ mit drei Sternen (***) markiert.

2.6 Expressionsanalyse

2.6.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) ist ein Verfahren, bei dem mRNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben wird. Die Gesamt-RNA wurde zunächst aus Oozyten extrahiert und danach mit Hilfe des Enzyms Superscript II reverser Transkriptase und Hexanukleotiden umgeschrieben. Für die Herstellung von cDNA wurde 1 µg RNA pro Ansatz eingesetzt und zusammen mit 0,5 µL Hexanukleotiden für 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde für 50 min bei 42 °C durchgeführt und anschließend das Enzym 10 min bei 75 °C inaktiviert.

Reverse Transkription - Reaktionsmix	
Komponente	Menge/Volumen
Gesamt-RNA	1 µg
H ₂ O	9 µL
Hexa-Primer	0,5 µL
10 min bei 70 °C, Abkühlung auf Eis	
5x RT-Puffer	5 µL
2 mM dNTP	6 µL
0,1 M DTT	2,5 µL
Superscript II	1 µL
Gesamt	25 µL

2.6.2 Qualitative RT-PCR

Um qualitative Aussagen darüber treffen zu können, ob Proteine in bestimmten Geweben exprimiert werden, wurde eine qualitative RT-PCR durchgeführt.

Für die Expressionsanalysen wurden folgende Komponenten angesetzt:

PCR (Reaktionsansatz für eine Reaktion)	
Komponente	Volumen
10x PCR Puffer (enthält 15mM MgCl ₂)	2 µL
2 mM dNTP	2 µL
Vorwärts-Primer [10 pmol]	2 µL
Rückwärts-Primer [10 pmol]	2 µL
DMSO	0,8 µL
cDNA	0,7 µL
AmpliTaq Gold Polymerase	0,12 µL
H ₂ O	10,38 µL
Gesamt	20 µL

Die PCR ist eine thermozyklische Reaktion und in drei Schritte während des Zyklus eingeteilt. Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA bei 95°C, um doppelsträngige DNA (dsDNA) in amplifizierbare einzelsträngige DNA (ssDNA) aufzuspalten. Im zweiten Schritt wird die Reaktion auf die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer eingestellt. Bei dieser Temperatur können sich die Primer an die komplementären Abschnitte der ssDNA anlagern. Im letzten Schritt wird die Temperatur auf das Reaktionsoptimum der *Taq*-Polymerase eingestellt, die ausgehend von der 3'-OH-Gruppe der Primer in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den Einzelstrang zum komplementären DNA-Doppelstrang synthetisiert. Es entstehen in einem Zyklus aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül zwei neue, identische Doppelstränge und so ist es möglich, die Ausgangs-DNA exponentiell zu vermehren.

Thermocyclereinstellung			
	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung der Polymerase	1	96°C	5 min
Denaturierung	35	96°C	30 s
Primer Anlagerung		55°C	30 s
Elongation		72°C	1,5 min
Endelongation	1	72°C	10 min
Kühlung		4°C	∞

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit 2,5 µL Ladepuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Außerdem wurde ein Längenstandard aufgetragen, um die Größe der Amplifikate abschätzen zu können.

2.7 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Anzuchtflaschen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37 °C in Vollmedium. Es wurde mit HEK293, HeLa und COS-7 Zellen gearbeitet.

Zusammensetzung des Mediums:

Medium	
Komponente	Konzentration
DMEM	500 mL
FCS 10%	10% (v/v)
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

Splitten von Zellkulturen

Zunächst wurde das Medium der Zellen mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mL 1x PBS gewaschen und mit 2 mL 0,05% Trypsin-EDTA für 3 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach einer Kontrolle unter dem Mikroskop, bei der überprüft wurde, ob sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde die Trypsinreaktion mit 7 mL Vollmedium abgestoppt. Der gesamte Ansatz wurde in ein 15 mL Falcon überführt und für 1 min bei 106 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 3 mL Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in gewünschter Verdünnung in eine neue, mit Vollmedium versetzte Zellkulturflasche, ausgesät. Zur Proteingewinnung aus HeLa Zellen wurden diese in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm überführt und mit Vollmedium versetzt. Für Patch-Clamp Messungen wurden HEK293 Zellen verwendet. Diese wurden in Nunc Schälchen mit einem Durchmesser von 3,5 cm eingesät und ebenfalls mit Vollmedium versetzt.

Auftauen von Zellkulturen

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen wurden dem Stickstofftank entnommen und anschließend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 5 mL vorgewärmtes Komplettmedium überführt und bei 106 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 3 mL frischem Vollmedium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension in eine neue Anzuchtflasche mit 5 mL Vollmedium überführt.

Einfrieren von Zellkulturen

Zum Ablösen der Zellen wurden diese trypsinisiert, in Medium aufgenommen und die Suspension für 1 min bei 106 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL fetalem Kälberserum (FCS) und 10% DMSO aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht langsam in einer speziellen, mit Isopropanol gefüllten Box bei -80°C eingefroren, bevor sie am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff überführt und für längere Zeit gelagert werden konnten.

Transiente Transfektion

Transiente Transfektion für Patch-Clamp Messungen

Um die gewünschten Proteine in HEK293 Zellen zu exprimieren, wurde eine transiente Transfektion mit Plasmid-DNA mittels der Transfektionsreagenz jetPRIME (Polyplus) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in Nunc Schälchen (Durchmesser 3,5 cm) eingesät und bei einer Konfluenz von 50% mit der transienten Transfektion begonnen. Für den Transfektionsansatz pro Nunc Schälchen wurden 200 µL jetPRIME Puffer und 1 µg Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert, 10 s gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurden 2 µL jetPRIME hinzugegeben, erneut 10 s gevortext, abzentrifugiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Medium der Zellen abgesaugt und mit 2 mL DMEM mit 10% FCS und 200 µL des Transfektionsansatzes ersetzt. 4 bis 8 h nach der Transfektion wurde das

Medium entfernt und durch 2 mL frisches DMEM mit 10% FCS ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 48 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Transiente Transfektion zur Gewinnung von Proteinlysaten

HeLa Zellen wurden zunächst in Petrischalen (Ø 6 cm) eingesät und bei einer Konfluenz von 80% transient transfiziert. Für einen Transfektionsansatz pro Schale wurden 400 µL jetPRIME Puffer und 5 µg Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert, für 10 s gevortext und anschließend abzentrifugiert. Danach wurden 7 µL der Transfektionsreagenz jetPRIME hinzugegeben, erneut 10 s gevortext, abzentrifugiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium der Zellen abgesaugt und mit 4 mL DMEM mit 10% FCS und 400 µL des Transfektionsansatzes ersetzt. 4 bis 8 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und durch 4 mL frisches DMEM mit 10% FCS ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 48 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Proteinisolierung aus HeLa Zellen

Die Herstellung von Proteinlysaten erfolgte 48h nach der Transfektion. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und auf Eis mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischalen gelöst. Danach wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min bei 214 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µL Triton X-100 Lysepuffer plus 5 µL Protease Inhibitor Cocktail aufgenommen, resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Als nächstes wurde für 30 min bei 16060 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Proteinlysat wurde bei -20°C gelagert oder direkt mit 2x Sodiumdodecylsulfat (SDS)- Probenpuffer 1:1 gemischt und 10 min bei 100% denaturiert.

PBS (10x)	
Komponente	Komponente
NaCl	1,37 mM
KCl	26,8 mM
Na ₂ PO ₄	80 mM
KH ₂ PO ₄	14,7 mM

Triton X- 100 Lysepuffer	
Komponente	Konzentration/Volumen
Triton X- 100	1% (v/v)
NaCl	150 mM
TRIS	50 mM
pH 7,5 einstellen	
Protease Inhibitor Cocktail	10 µL/mL

2x SDS Probenpuffer	
Komponente	Konzentration
TRIS/HCL, pH 6,8	125 mM
Glycerol	20% (v/v)
DTT	100 mM
SDS	4% (w/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)

2.8.2 Proteinquantifizierung: BCA Protein Assay

Um die Konzentration von Proteinlysaten zu bestimmen, wurde der BCA Protein Assay der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Veränderung der Farbe dient als indirekter Indikator für die jeweilige Proteinkonzentration. Zunächst wurden die BCA Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 gemischt. Jeweils 190 µL dieser Lösung wurden zu 10 µL Proteinlösung sowie den BSA Standardverdünnungen gegeben, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Erstellen der BSA Standardkurve wurden jeweils 2 µL der angesetzten Proben auf die Detektionsoberfläche des NanoDrop-Gerätes pipettiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen. Anhand des BSA-Standards und der daraus erstellten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.8.3 Koimmunopräzipitation

Zur Bestätigung der Protein-Protein Interaktion wurde die Methode der Koimmunopräzipitation durchgeführt. Zunächst wurde der GFP-Antikörper gemäß Herstellerangaben an magnetische Kügelchen (Dynabeads®M-270Epoxy) gekoppelt. Hierzu wurden 10 mg der Beads in 1 mL C1-Lösung der Firma invitrogen durch auf und ab pipettieren in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gewaschen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf einen Magneten gestellt, um die magnetischen Beads vom Überstand zu trennen. Danach wurden 10 µL des Antikörpers und 490 µL C1-Lösung zu den aufgereinigten Beads gegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Anschließend wurden 500 µL der C2-Lösung zu dem gesamten Ansatz hinzugegeben und über Nacht auf einem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads viermal in 800 µL Puffer gewaschen und anschließend in 1 mL Aufbewahrungspuffer bei 4 °C gelagert.

Danach wurde die Koimmunopräzipitation ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden die Antikörper-gekoppelten Beads mit Extraktionspuffer A gewaschen, danach zu 200 µL der Zelllysate gegeben und für 30 min bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden die Beads viermal mit Waschpuffer gewaschen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, bevor sie in 60 µL Elutionspuffer resuspendiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und 10 min bei 100°C denaturiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht (siehe 2.8.4).

Extraktionspuffer A	
Komponente	Konzentration /Menge/Volumen
5x IP	1x
NaCl	100 mM
Protease Inhibitor	10 µL/mL
ddH ₂ O	auffüllen auf Endvolumen

Wasch Puffer (Co-IP)	
Komponente	Konzentration /Menge/Volumen
5x LWB	1x
Tween 20	0,02%
ddH ₂ O	auffüllen auf Endvolumen

2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Das im Gel enthaltene SDS bindet an Proteine und sorgt für eine negative Ladung aller Proteine, so dass die Auftrennung lediglich auf Unterschieden im Molekulargewicht beruht. Zunächst wurden zwei Glasplatten in eine Apparatur von der Firma Biorad eingespannt. Als nächstes wurde das Trenngel hergestellt, bis zwei Zentimeter unterhalb der Kante der Glasplatte gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen, wobei ein Gelkamm eingesetzt wurde, um Taschen zum Auftragen der Proben zu formen.

Trenngel			
Komponente	Konzentration/Volumen		
	8%	10%	12%
30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid	2,66 mL	3,33 mL	4 mL
H ₂ O	3,87 mL	3,2 mL	2,53 mL
Trenngelpuffer	3,33 mL	3,33 mL	3,33 mL
10% SDS (w/v)	100 µL	100 µL	100 µL
APS	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

Sammelgel (4%)	
Komponente	Volumen
30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid	1,33 mL
H ₂ O	6,57 mL
Sammelgelpuffer	2 mL
10% SDS (w/v)	100 µL
APS	100 µL
TEMED	10 µL

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämme entfernt und das fertige Polyacrylamidgel in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt. Diese wurde mit 1x Elektrodenpuffer aufgefüllt und die Taschen mit 2x SDS Ladepuffer sowie den denaturierten Proteinlysaten beladen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 35 mA (1 Gel) bzw. 50 mA (2 Gele) und einer Spannung von 200 mV für 50 min.

10x Elektrodenpuffer	
Komponente	Konzentration
TRIS	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)
pH 8,3 mit NaOH einstellen	

2.8.5 Westernblot

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend unter semitrockenen Bedingungen auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 50 mA.

Hierzu wurden jeweils drei Lagen in Puffer getränktes Filterpapier (Roth; 1,5 mm), eine Nitrozellulosemembran und das Polyacrylamidgel geschichtet.

Im Anschluss wurde die Membran für 1-2 h in 1x RotiBlock Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu blockieren. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem in Rotiblock verdünnten Primärantikörper. Anschließend wurde dreimal mit RotiBlock für je 10 min gewaschen und für 1 h mit einem Sekundärantikörper der Firma LI-COR, welcher mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert ist, im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper abgenommen und die Membran erneut dreimal mit RotiBlock für jeweils 10 min gewaschen. Die Visualisierung und Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem Odyssey Infrarot Imaging System von LI-COR bei entsprechenden Wellenlängen zwischen 680 nm und 800 nm. Zu Dokumentationszwecken wurden die Westernblots anschließend digital gespeichert.

Blotting Puffer	
Komponente	Konzentration/Volumen
TRIS	50 mM
Glycin	40 mM
SDS	1,3 mM
Methanol	20% (v/v)
ddH ₂ O	auf 1 L auffüllen

2.9 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Um eine direkte Interaktionen von integralen Membranproteinen oder membranassoziierten Proteinen *in vivo* nachzuweisen, wurde das Split Ubiquitin Hefe-Zwei-Hybrid Membran Protein Kit von Mobitec verwendet. In diesem System wurde das Protein Ubiquitin in einen C-terminalen Teil (Cub) und einen N-terminalen Anteil (Nub) gespalten. Durch eine Punktmutation in Nub des Ubiquitins wurde die Affinität von Nub und Cub drastisch verringert und eine spontane Verbindung der beiden Proteinsegmente beseitigt. Um mögliche Interaktionspartner zu untersuchen, wurde ein Protein als Köder (*Bait*) und der eventuelle Interaktionspartner als Beute (*Prey*) eingesetzt. Der Ködervektor (pBT3-N) kodiert für Cub und einen Reporterprotein-Komplex (artificialer TF-reporter complex), welcher aus der LexA DNA-bindenden Domäne und dem *Herpes simplex* VP16 Transaktivator besteht. Durch Klonierung einer zu untersuchenden Gensequenz in den pBT3-N-Vektor kann das C-terminale Ubiquitinsegment mit dem entsprechenden Protein fusioniert werden. Der Beutevektor (pPR3-N) kodiert für das mutierte Nub und kann durch Klonierung einer bestimmten Gensequenz in pPR3-N ebenfalls an bestimmte Proteine gekoppelt werden. Beide Vektoren werden zusammen in Hefe transformiert. Kommt es zur Interaktion der beiden Proteine, nähern sich auch Nub und Cub an und eine Ubiquitin-spezifische Protease (UBP) kann den an Cub angehefteten Reporterprotein-Komplex abspalten. Dieser wandert in den Zellkern, bindet und aktiviert die Reportergene His3, lacZ und Ade. Die Hefezelle kann somit bei einer Interaktion der beiden Proteine Histidin und Adenin synthetisieren und auf Selektionsmedium (ohne Histidin und Adenin) wachsen. Weiterhin wird in der Hefezelle das Enzym β -Galactosidase gebildet, welches im X-Gal Assay durch Blaufärbung nachgewiesen werden kann.

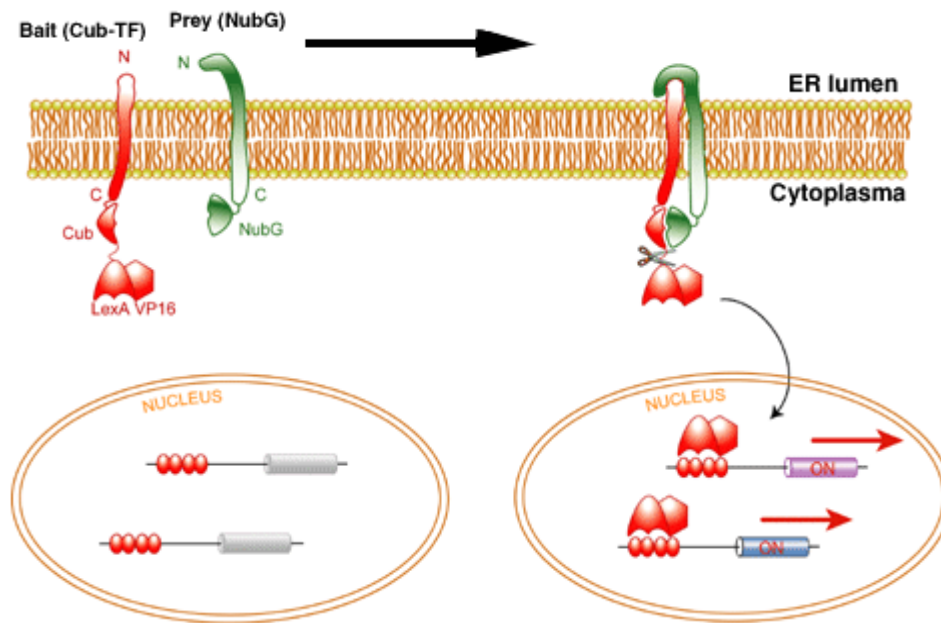


Abb. 2.6 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems - Schematische Darstellung

Tritt eine direkte Interaktion zwischen Köder (Bait) und Beute (Prey) auf, gelangen der C-terminale Teil (Cub) und der N-terminale Anteil (Nub) des gesplitteten Ubiquitins in unmittelbare Nähe. Die Ubiquitin-spezifische Protease (UBP) spaltet dann den Reporterprotein-Komplex von Cub. Dieser gelangt in den Zellkern, um die entsprechenden Zielgene zu aktivieren. (nach MoBiTec).

2.9.1 Hefe Transformation

Bei der Transformation des Beute- und Köderproteins in Hefezellen wurden 50 mL YPAD-Medium mit einem Hefeklon des Stammes NMY51 angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Ein Teil der Übernachtskultur wurde am nächsten Tag in frisches YPAD-Medium überführt und mit Hilfe des Spektrometers auf eine optische Dichte (OD) von 0,2 bei 546 nm eingestellt.

Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 30°C bis zu einer OD von 0,6. Danach wurde die Hefekultur für 15 min bei 880 g abzentrifugiert und das Pellet in 2,5 mL autoklaviertem Wasser resuspendiert. Parallel dazu wurde der PEG/LiOAc Master Mix angesetzt.

PEG/LiOAc Master Mix für 1 Transformation	
Komponente	Volumen
PEG (50%)	240 µL
1M LiOAc	36 µL
denaturiertes Lachssperma (100µg/ml)	25 µL

100 µL der Hefe-Suspension, 300 µL des Mastermix und 0,5 µg der Plasmid-DNA des Beute- und Köderproteins wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, 20 s gevortext und für 45 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz für 5 min bei 503 g zentrifugiert, das Pellet in 100 µL 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und unter der Sterilbank auf Leucin und Tryptophan freien (-LW) SD-Platten ausgestrichen und für drei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert.

YPAD-Medium	
Komponente	Konzentration
YPD Medium	50 g/L
Adeninsulfat	40 mg/L

2.9.2 Hefe-Spotting

Um die direkte Interaktion zweier Proteine in Hefe zu testen, wurden fünf voneinander unabhängige Hefeklonen, die auf SD-LW Platten gewachsen waren und somit beide Plasmide aufgenommen hatten, auf SD-LWHA Platten gespottet. Dazu wurde jeweils ein Hefeklon mit einer Pipettenspitze von der SD-LW-Platte gepickt und in 50 µL 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert. Danach wurden 2 µL der Suspension auf eine neue SD-LW-Platte und eine SD-LWHA-Platte aufgetropft und für drei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert.

2.9.3 X-Gal Assay

Bei einer Interaktion der Proteine wird das *lacZ*-Gen aktiviert, welches für das Enzym β-Galactosidase kodiert. Wird in der Hefe das Enzym β-Galactosidase gebildet, kann dieses in einem X-Gal Assay durch Blaufärbung nachgewiesen werden.

Dazu wurden die Hefeklone auf Filterpapier übertragen und in flüssigem Stickstoff für 5 min schockgefroren. Danach wurden die Filterpapiere in Petrischalen gelegt, 5 min aufgetaut und anschließend mit 10% X-Gal und 0,5% Agarose, gelöst in 1x PBS, überschichtet. Nach 2-6 Stunden wurden die Platten eingescannt und anhand der Blaufärbung konnte eine qualitative Aussage über die Interaktion getroffen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2

2010 konnte mittels eines Hefe-Screenings mit humaner Gehirn- und humaner Lungen-cDNA-Bank das Enzym Hämoxygenase-2 (HO-2) als ein Interaktionspartner für TREK-1 in beiden Geweben identifiziert werden. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (MoBiTec) konnte die direkte Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 bestätigt werden (Koschinsky 2010). Im Rahmen dieser Arbeit werden die Interaktion und ihre funktionellen Auswirkungen mit weiteren Methoden untersucht.

3.1.1 Koimmunopräzipitation von TREK-1 und HO-2

Um die Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 in humanen Zellen zu bestätigen, wurde eine Koimmunopräzipitation in HeLa-Zellen durchgeführt. In Voruntersuchungen zeigte sich, dass die kommerziell angebotenen Antikörper für TREK-1 und HO-2 nicht für die Immunopräzipitation geeignet waren. Aus diesem Grund wurde die DNA des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) carboxyterminal an die TREK-1c cDNA fusioniert. Die Fusion von EGFP an den Carboxyterminus von TREK-1 führte zwar zu einer Reduktion der Oberflächenexpression und Stromamplitude, die subzelluläre Lokalisation des Kanals wurde jedoch nicht verändert. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt TREK-1c-EGFP für Koimmunopräzipitationsuntersuchungen eingesetzt.

Zur Durchführung der Koimmunopräzipitation wurde zunächst TREK-1c-EGFP transient in HeLa Zellen exprimiert. Da das Enzym HO-2 in dieser Zelllinie endogen relativ stark exprimiert wird, war eine zusätzliche Transfektion von HO-2 nicht nötig. Als Kontrollen wurden HeLa-Zellen, welche mit dem Klonierungsvektor pEGFP transfiziert wurden, sowie nicht transfizierte Zellen verwendet. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate hergestellt, die mit den EGFP-gekoppelten magnetischen Beads inkubiert wurden (siehe 2.8.3). Anschließend wurden die gebundenen Proteine eluiert, in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Mit Hilfe des GFP-Antikörpers konnten die immunopräzipitierten Proteine EGFP (Molekulargewicht von ~30 kDa) und

TREK-1c-EGFP (als Doppelbande Molekulargewicht von ~74 kDa) detektiert werden (Abb. 3.1 A). Die endogen in HeLa-Zellen exprimierte HO-2 konnte mittels spezifischem HO-2 Antikörper (Molekulargewicht von 42 kDa) detektiert werden. Außerdem konnte HO-2 mit TREK-1c-EGFP koimmunopräzipitiert werden, während in den verwendeten Kontrollen keine Koimmunopräzipitation von HO-2 zu erkennen war (Abb. 3.1 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass TREK-1c-EGFP und HO-2 miteinander interagieren.

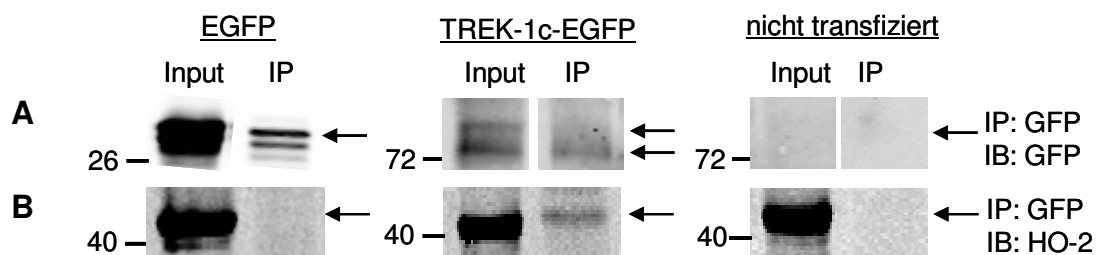


Abb. 3.1 Westernblots nach Koimmunopräzipitation von TREK-1 und HO-2

(A) HeLa Zellen transfiziert mit pEGFP-Klonierungsvektor, TREK-1c-EGFP und nicht transfiziert (Input). Nach Immunopräzipitation wurde mit GFP-Antikörper (IP) angefärbt (EGFP bei ~30 kDa, TREK-1c-EGFP bei ~74 kDa) (B) Endogene HO-2 (Input) und nach Koimmunopräzipitation angefärbt mit HO-2 Antikörper (IP) (HO-2 bei 43 kDa).

3.1.2 Direkte Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2

Nachdem HO-2 als Interaktionspartner für TREK-1 identifiziert werden konnte, wurde die Interaktion zwischen TREK-1 und der Isoform HO-1 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwischen HO-1 und TREK-1 keine direkte Interaktion vorliegt (Kocher 2012). Aus dem Sequenzvergleich der beiden Isoformen (durchgeführt mit dem Alignment-Programm „clustalw“) wurde ersichtlich, dass die stärksten Unterschiede im Aminoterminus, im Bereich der hämregulatorischen Motive 2 und 3, und im Carboxyterminus liegen (Abb. 3.2).


```

hHO-2      MSAEVETSEGVDESEKKNNGALEKENQMRMADLSELLKEGTKEADRAENTQFVKDFLKG 60
hHO-1      -----MERPQPDSP-----QDLSEALKEATKEVHTQAENAEFMRNFQKG 40
              *: : : : :      ***** : : : : :
hHO-2      NIKKELFKLATTALYFTYSALEEEMERNKDHAPAFAPLYFPMELHRKEALTKDMEYFFGEN 120
hHO-1      QVTRDGFKLVMASLYHIYVALEEEIERNKESPVFAPVYFPEELHRKAALEQDLAFWYGP 100
              : : : : * : : * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hHO-2      WEEQVQPKAAQKYVERIHYIGONEPELLVAHAYTRYMGDLGGQVLKKVAQRALKLPST 180
hHO-1      WQEVIPYTPAMQRYVKRLHEVGRTEPELLVAHAYTRYLGDLSGGQVLKKIAQKALDLPSS 160
              *: * : . * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hHO-2      GEGTQFYLFENVDNAQQFKQLYRARMNALDLNMKTKERIVEEANKAFEYNMQIFNEIDQA 240
hHO-1      GEGLAFFTFPNIASATKFKQLYRSRMSLEMTPAVRQRVIEEAKTAFLLNIQLFEELQEL 220
              *** * : * * : . * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hHO-2      GSTLARETLEDGFPVHDGKGDMRKPFYAAEQDKGALEGSSPFRTAMAVLRKPSLQFIL 300
hHO-1      LTHDTKDQSPSRAPGLRQRASNKVQDSAPVETPRGKP-----PLNTRS---QAPLLRWVL 272
              : : : : . * : : : : . * : * : : * : : : : : * : : : :
hHO-2      AAGVALAAGLLAWYYM 316
hHO-1      TLSFLVATVAVGLYAM 288
              : . . : * : : . * *

```

Abb. 3.2 Sequenzvergleich von Hämoxygenase-2 (HO-2) und Hämoxygenase-1 (HO-1)

His45 und His25 in der katalytischen Domäne sind in beiden Isoformen rot hinterlegt. Die hämregulatorischen Motive in Isoform HO-2 sind grün unterlegt. Bereiche, die sich stark unterscheiden, sind grau unterlegt. Alle Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt, übereinstimmende Aminosäuren sind mit * markiert.

Um die Interaktionsdomäne genauer zu charakterisieren, wurden Punktmutationen und Deletionsmutationen in HO-2 eingeführt und die Interaktion mit TREK-1 im Hefe-Zwei-Hybrid System untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob die Aktivität des Enzyms für die Interaktion mit TREK-1 erforderlich ist. Dazu wurde die Aminosäure Histidin an Aminosäureposition 45 zu Asparagin (HO-2^{H45N}) mutiert, womit die Stabilisierung des Häms im HO-2 Enzym verhindert wird und der Häm-Abbau nicht mehr stattfinden kann (Ishikawa 1998). Des Weiteren wurden Deletionen im aminoterminalen Bereich der HO-2 vorgenommen, um die funktionell bedeutenden katalytischen Domänen und den Bereich der hämregulatorischen Motive 2 und 3 auszuschalten. Hierzu wurde HO-2 zum einen bis zu der Aminosäure Methionin an Position 231 (HO-2^{Δ1-230}) und zum anderen bis zu der Aminosäure Methionin an Position 288 verkürzt (HO-2^{Δ1-287}).

Zur Untersuchung der Interaktion wurde das Split Ubiquitin Hefe-Zwei-Hybridsystem (MoBiTec) verwendet. Zunächst wurde TREK-1 im Ködervektor pBT3-N und HO-2, sowie HO-2 Mutanten, im Beutevektor pPR3-N in den Hefestamm NMY51 transformiert und auf SD-LW Platten (-LW) ausgestrichen. Ein Wachstum von Hefekolonien nach 3-4 Tagen auf diesen Platten zeigt an, dass beide Plasmide in der Hefe aufgenommen wurden. Danach wurden jeweils fünf dieser Klone auf Platten mit dem Selektionsmedium SD-LWHA (-LWHA) gespottet und für weitere 3-4 Tage inkubiert. Ein Wachstum der

Hefekolonien auf diesen Platten zeigt eine direkte Interaktion der beiden Plasmide an, welche zusätzlich in einem X-Gal Assay durch die Blaufärbung der Klone bestätigt wurde.

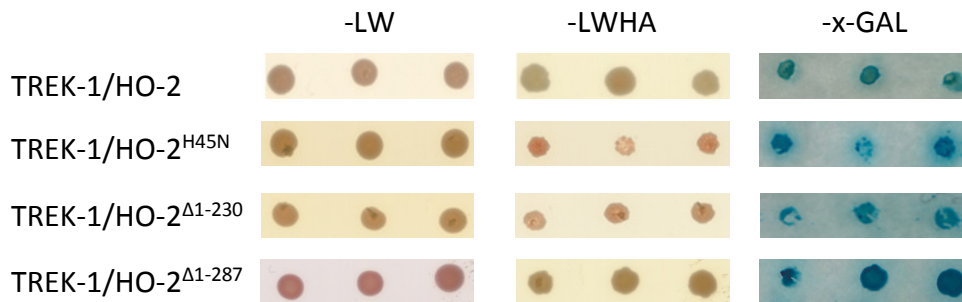


Abb. 3.3 Direkte Interaktion von TREK-1 und HO-2 Mutanten im Hefe-Zwei-Hybrid System

Es sind Hefeklonen dargestellt, die nach Transformation hTREK-1c (in pBT3-N) und HO-2, HO-2^{H45N}, HO-2^{Δ1-230}, HO-2^{Δ1-287} (in pPR3-N) aufgenommen haben. Ein Wachstum der transformierten NMY51 Hefekolonien auf –LW Medium zeigt die positive Transformation beider Konstrukte. Ein Wachstum auf –LWHA Medium, sowie eine Blaufärbung im X-GAL Assay zeigt jeweils die positive Interaktion der untersuchten Konstrukte.

TREK-1 interagiert sowohl mit der katalytisch inaktiven HO-2^{H45N} Mutante, als auch mit den beiden Deletionsmutanten HO-2^{Δ1-230} und HO-2^{Δ1-287}. Die funktionellen Regionen vor Aminosäure Methionin 288 scheinen nicht essentiell für eine Interaktion zu sein (Abb.3.3).

3.1.3 TREK-1 Strommessungen nach Koexpression von HO-2

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion von TREK-1 mit HO-2 funktionelle Auswirkungen auf die Kanalaktivität hat. Strommessungen in *Xenopus* Oozyten zeigten, dass die Koexpression von TREK-1 und HO-2 zu einer Erhöhung der Stromamplitude des Kanals führt (Koschinsky 2010).

Hier wurde nun untersucht, ob das katalytisch inaktive Enzym HO-2^{H45N}, welches im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit TREK-1 interagiert, ebenfalls eine funktionelle Auswirkung auf TREK-1 hat.

Hierzu wurde mittels *in vitro* Transkription cRNA von TREK-1, HO-2 und HO-2^{H45N} hergestellt und in einem Verhältnis von 1:8 (TREK-1:HO-2) in *Xenopus* Oozyten injiziert (siehe 2.3.1). In den Messungen wurde das Haltepotential auf -80 mV gehalten und danach das Potential mit Hilfe einer langsamen Spannungsrampe von -120 bis auf +40 mV geklemmt. Die

resultierenden Strom-Spannungskurven sind in Abb. 3.4 A dargestellt. Die Auswertung der Ströme erfolgte bei 0 mV.

Die Koexpression von TREK-1 und HO-2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude des Kanals um 20%, während die Koexpression von TREK-1 mit HO-2^{H45N} keine signifikante Änderung in der Stromamplitude des Kanals zeigte (Abb. 3.4 B).

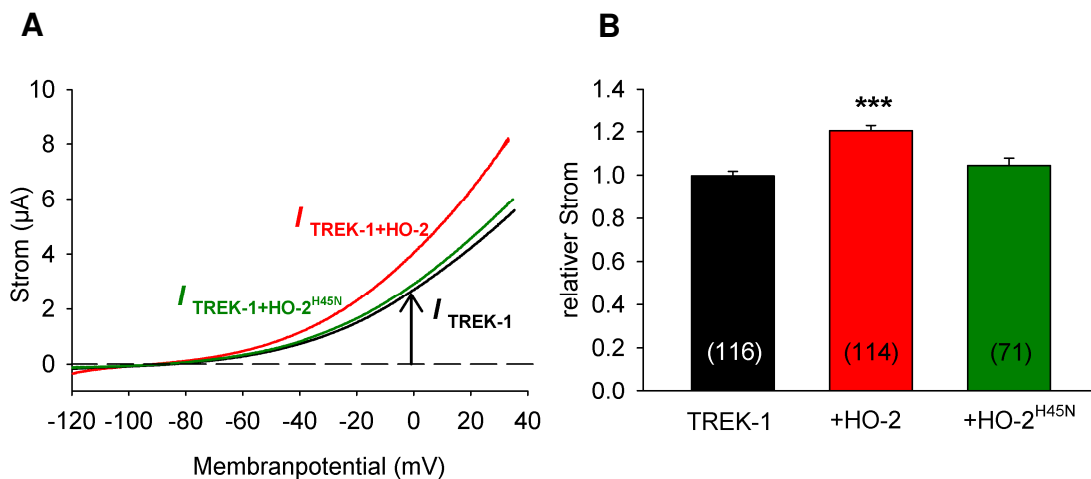


Abb. 3.4 Strommessungen von TREK-1 mit HO-2 und HO-2^{H45N} in *Xenopus* Oozyten
(A) Strom-Spannungskurve von TREK-1 (schwarz), nach Koexpression mit HO-2 (rot) und HO-2^{H45N} (grün). **(B)** Relative Stromamplitude von TREK-1 unter dem Einfluss von HO-2 und HO-2^{H45N}. Die Stromamplituden wurden bei 0 mV ausgewertet, gemittelt und auf den Stromwert des TREK-1 normiert. Als Fehler ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen t-Test mit $p < 0,001$ (***) bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben.

3.1.4 Oberflächenexpression von TREK-1 nach Koexpression mit HO-2

Aus den Strommessungen ist nicht ersichtlich, ob die Erhöhung der Stromamplitude von TREK-1 nach Koexpression mit HO-2 durch eine erhöhte Kanaldichte in der Plasmamembran oder durch eine Aktivitätsveränderung des TREK-1 verursacht wird. Um dies zu klären, wurde die Oberflächenexpression von TREK-1 in *Xenopus* Oozyten mittels Chemolumineszenz quantifiziert.

Hierzu wurde ein HA-Epitop an Aminosäure 277 im TREK-1c Kanal eingeführt, welches auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran präsentiert wird (Abb. 3.5 A). Die cRNA von TREK-1c-HA, HO-2 und HO-2^{H45N} wurde in einem Verhältnis von 1:8 in *Xenopus* Oozyten injiziert.

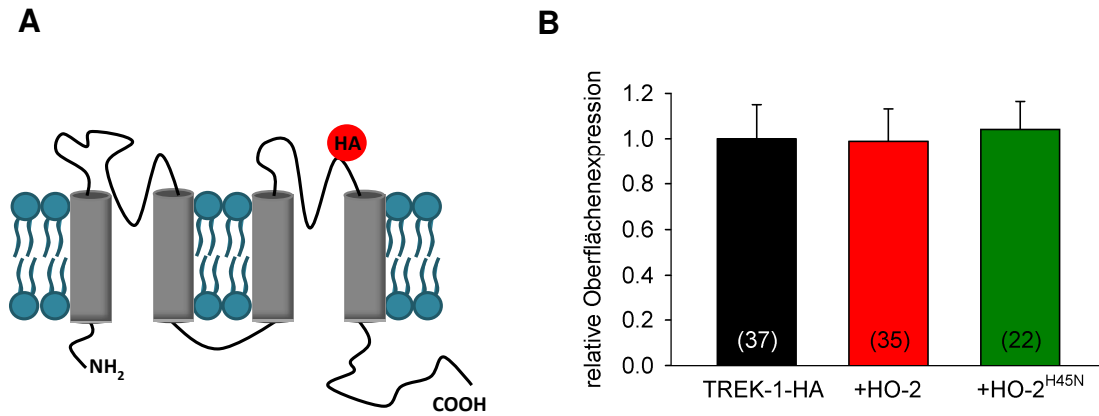


Abb. 3.5 Oberflächenexpression von TREK-1 mit HO-2 und HO-2^{H45N} in *Xenopus* Oozyten
(A) Schematische Darstellung des TREK-1-HA. Das Hämagglutininepitop (HA, rot) wurde an Aminosäureposition 277 eingeführt. **(B)** Die relative Oberflächenexpression von TREK-1 unter dem Einfluss von HO-2 und HO-2^{H45N}. Als Fehler ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Anzahl der untersuchten Oozyten ist in Klammern angegeben.

Die relative Oberflächenexpression von TREK-1 in der Plasmamembran wurde nach Koexpression von HO-2 und HO-2^{H45N} nicht verändert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Erhöhung der Stromamplitude des Kanals durch HO-2 auf eine Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals zurückzuführen ist.

3.1.5 Expressionsanalyse endogener HO-2 in *Xenopus* Oozyten

Die HO-2 wird in verschiedenen Spezies konstitutiv exprimiert. Um zu untersuchen, ob HO-2 auch in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird, wurde eine RT-PCR mit isolierter Gesamt-RNA aus Oozyten durchgeführt (siehe 2.6.2). Als Positivkontrolle wurde die Expression des konstitutiv in allen Zellen exprimierten Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die PCR-Proben wurden anschließend auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert und durch Sequenzierung die Identität der Amplifikate bestätigt. Es zeigte sich, dass HO-2 endogen in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird (Abb. 3.6).

xHO-2 xGAPDH

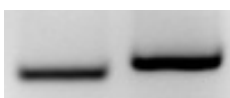


Abb. 3.6 Expressionsanalyse von HO-2 in *Xenopus* Oozyten

Die Expression der HO-2 in *Xenopus* Oozyten wurde mittels RT-PCR aus Oozyten Gesamt-RNA untersucht. Als Positivkontrolle wurde die Expression der GAPDH verwendet. Die PCR-Proben wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert (xHO-2 197 bp; xGAPDH 240 bp).

3.1.6 Wirkung von Hämin auf HO-2 und auf den TREK-1 Strom

Die bisherigen Experimente zeigten, dass die enzymatisch inaktive HO-2^{H45N} zwar direkt mit TREK-1 interagiert, jedoch keine funktionellen Auswirkungen auf die Stromamplitude des Kanals hat. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die enzymatische Aktivität der HO-2 für die Erhöhung der Stromamplitude verantwortlich ist.

Hierzu wurden elektrophysiologische Strommessungen in *Xenopus* Oozyten unter Verwendung von Hämin durchgeführt. Hämin ist ein Substrat der HO-2, das nach Bindung an das Enzym sauerstoff- und NADPH-abhängig zu Biliverdin, Fe³⁺ und Kohlenstoffmonoxid (CO) abgebaut wird. Zunächst wurden die Oozyten mit TREK-1 und HO-2 cRNA im Verhältnis 1:8 injiziert und gemessen. Eine Applikation von Hämin über 4 min führte zu einer Erhöhung der Stromamplitude des TREK-1 auf das 2-fache; diese Erhöhung war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Applikation auf 1 normiert und mit den Kontrollbedingungen (Applikation von 1xND96 Lösung) verglichen (Abb. 3.7 B).

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von Hämin auf TREK-1 mit und ohne Koexpression der katalytisch inaktiven Mutante HO-2^{H45} verglichen. Applikation von Hämin führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude des TREK-1 um $58 \pm 7\%$ bzw. $42 \pm 7\%$ (Abb. 3.7 A und C). Ein Vergleich der Stromamplituden bei einem Membranpotential von 0 mV zeigt, dass für TREK-1 alleine und TREK-1 koexprimiert mit HO-2^{H45N} der Strom nach Applikation von Hämin signifikant geringer war als in den Experimenten, in denen TREK-1 mit HO-2 koexprimiert wurde (Abb. 3.7 D). Zur Kontrolle wurden die Kanäle TASK-3 und Kir2.1 untersucht, die nicht mit HO-2 interagieren (Koschinsky 2010, Kocher 2012). Die Stromamplituden von TASK-3 und Kir2.1 waren nach Applikation von Hämin nicht signifikant verändert (Abb. 3.7 D).

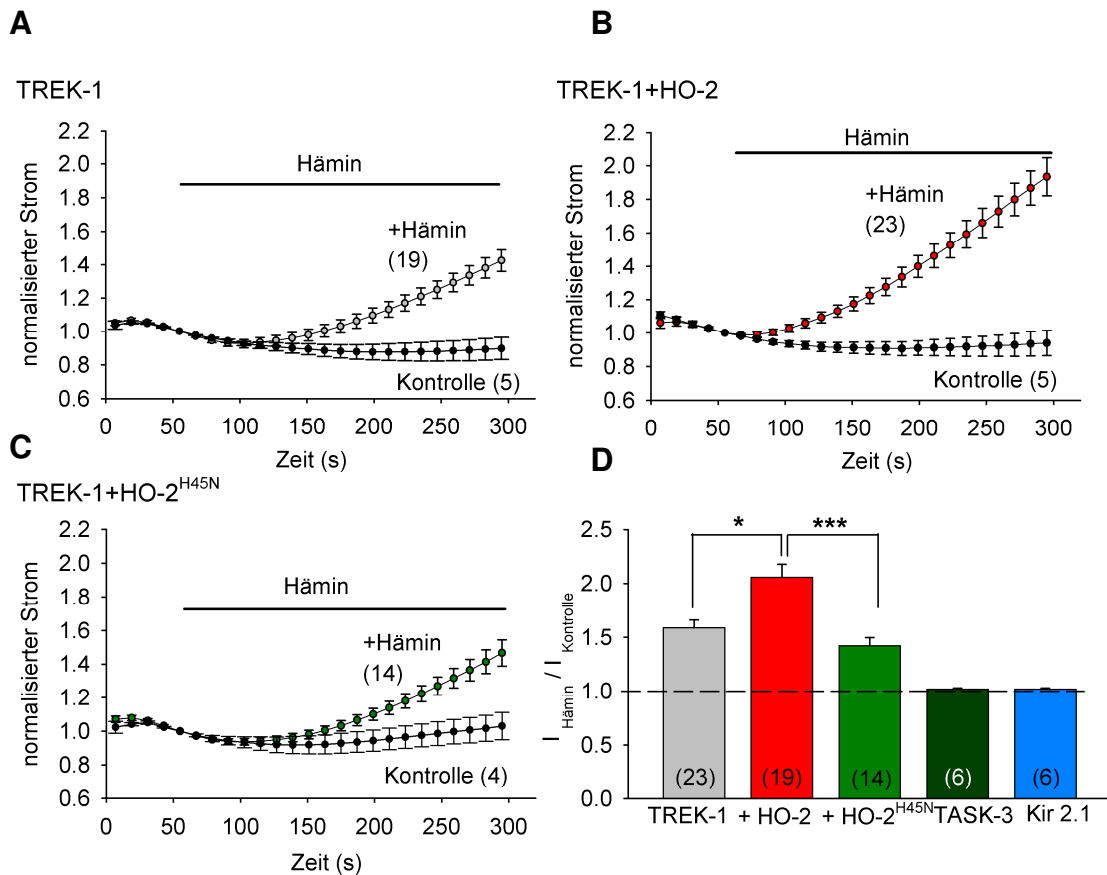


Abb. 3.7 Strommessungen von TREK-1 mit HO-2 und HO-2^{H45N} in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe von Hämin

(A) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude nach Applikation von Hämin und unter Kontrollbedingungen. (B) Zeitverlauf der Stromamplitude von TREK-1 koexprimiert mit HO-2 nach Applikation von Hämin und unter Kontrollbedingungen. (C) Zeitverlauf der Stromamplitude von TREK-1 koexprimiert mit HO-2^{H45N} nach Applikation von Hämin und unter Kontrollbedingungen. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Applikation auf 1 normiert und gemittelt. (D) Stromamplituden von TREK-1 und TREK-1 koexprimiert mit HO-2 und HO-2^{H45N}, TASK-3 und Kir2.1 nach Zugabe von Hämin. Stromamplituden wurden 4 min nach Applikation von Hämin ausgewertet und auf Kontrollbedingungen normiert. Die Stromamplituden von TREK-1 und TASK-3 wurden bei 0 mV, Ströme von Kir2.1 bei -120 mV ausgewertet. Als Fehler ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt, mit $p < 0,01$ (**) und mit $p < 0,001$ (***), die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben.

Da unter 3.1.5 bereits gezeigt wurde, dass HO-2 endogen in den *Xenopus* Oozyten exprimiert wird, lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass Hämin die endogene HO-2 katalytisch aktiviert und dass die Reaktionsprodukte zu einer Erhöhung der Stromamplitude des TREK-1 Kanals führen. Die Koexpression der humanen HO-2 führte zu einer gesteigerten Aktivierung des Kanals durch Hämin, während die Koexpression der katalytisch inaktiven Form der humanen HO-2^{H45N} keinen zusätzlichen Effekt auf die Stromamplitude hatte.

3.1.7 Wirkung von Zinkprotoporphyrin (ZnPP) auf HO-2 und TREK-1

Wenn eine Steigerung der HO-2 Enzymaktivität zu einer Zunahme der TREK-1 Stromamplitude führt (siehe 3.1.6), sollte die enzymatische Inhibition des Enzyms das Gegenteil bewirken. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden elektrophysiologische Messungen in *Xenopus* Oozyten unter Verwendung des HO-Inhibitors Zinkprotoporphyrin (ZnPP) durchgeführt. ZnPP ist ein synthetisches Analogon des körpereigenen Häms, das die HO-2 in ihrer katalytischen Aktivität mit einem IC_{50} Wert von $2,65 \mu M$ kompetitiv hemmt (Wong et al. 2011). Die Stromamplitude des humanen TREK-1 wird durch Zn^{2+} -Konzentrationen zwischen $1-10 \mu M$ nicht signifikant verändert (Gruss et al. 2004). ZnPP wurde in einer Konzentration von $10 \mu M$ und Zinkchlorid ($ZnCl_2$) als Kontrolle in einer Konzentration von $1 \mu M$ eingewaschen, um in beiden Lösungen vergleichbare Konzentrationen an freiem Zn^{2+} zu erhalten (Rosa et al. 2012). Zunächst wurden die Oozyten mit TREK-1 cRNA injiziert oder mit TREK-1 und HO-2 bzw. $HO-2^{H45N}$ cRNA im Verhältnis 1:8 koinjiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Stromamplituden vor und nach dem Einwaschen von ZnPP bzw. $ZnCl_2$ bei 0 mV verglichen.

In Abb. 3.8 A ist der Zeitverlauf des TREK-1 Stromes nach Koexpression mit HO-2 unter Verwendung von ZnPP und $ZnCl_2$ exemplarisch dargestellt. Die Zugabe des HO-Inhibitors ZnPP führte zu einer 20%igen Reduktion der Stromamplitude von TREK-1 nach Koexpression mit HO-2 (Abb. 3.8 B, rote Balken). Bei Expression von TREK-1 alleine (ohne zusätzliche HO-2) führte das Einwaschen von ZnPP weiterhin zu einer Reduktion des Stromes um 11% (Abb. 3.8 B, graue Balken); nach Koexpression von TREK-1 mit $HO-2^{H45N}$ führte ZnPP zu einer Reduktion der Stromamplitude von 13% (Abb. 3.8 B, grüne Balken). Das Einwaschen der Kontrolle $ZnCl_2$ führte zu keiner signifikanten Veränderung der Stromamplitude (Abb. 3.8 B, quergestreifte Balken). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TREK-1 durch die endogen exprimierte HO-2 (siehe 3.1.5) reguliert werden kann, dass eine zusätzliche Expression des katalytisch aktiven Enzyms diesen Effekt verstärkt, während die Koexpression mit $HO-2^{H45N}$ keinen zusätzlichen Effekt auf den Kanal hat.

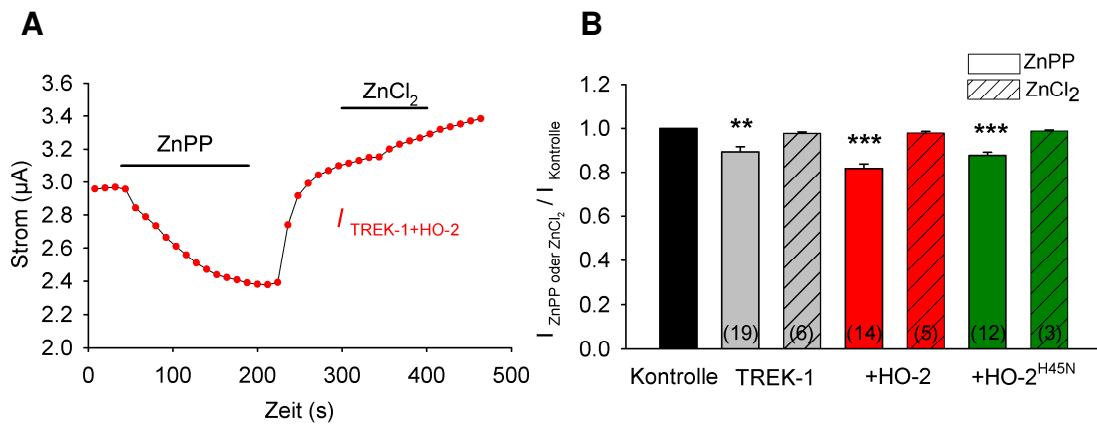


Abb. 3.8 Strommessungen von TREK-1 und TREK-1 mit HO-2 oder HO-2^{H45N} nach Zugabe von ZnPP

(A) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude nach Koexpression mit HO-2 bei 0 mV nach Applikation des HO-Inhibitors ZnPP und ZnCl₂. (B) Stromamplitude von TREK-1 unter dem Einfluss von HO-2 und HO-2^{H45N} und nach Zugabe von ZnPP und ZnCl₂. Die Stromamplituden wurden bei 0 mV ausgewertet, auf den Stromwert vor dem Einwaschen von ZnPP bzw. ZnCl₂ normiert und gemittelt. Als Fehler ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt, mit $p < 0,01$ (**) und mit $p < 0,001$ (***), die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben.

3.2 Untersuchungen mit Kohlenstoffmonoxid (CO)

Wie bereits unter 1.4 beschrieben, katalysiert HO-2 den Abbau von Häm zu Biliverdin, Fe²⁺ und CO. Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht die Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2, sondern die Aktivität des Enzyms zu einer Erhöhung der Stromamplitude von TREK-1 führt. Im nächsten Schritt wurde daher die Wirkung des Reaktionsprodukts CO auf TREK-1 untersucht.

3.2.1 Wirkung von CO auf den TREK-1 Strom in *Xenopus* Oozyten

Zur Untersuchung des CO-Effekts auf den TREK-1 Kanal wurden elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus* Oozyten durchgeführt und verschiedene CORMs (*CO-releasing-molecules*) und CO-Gas appliziert. Die *Xenopus* Oozyten wurden mit TREK-1 cRNA injiziert; nach 48-stündiger Inkubation wurde das Membranpotential auf -80 mV gehalten und anschließend eine Spannungsrampe von -120 bis + 40 mV mit einer Dauer von 9 Sekunden verwendet (siehe Abb. 2.1). In jeder Oozyte wurde der Strom über 5,5 min gemessen, wobei nach einer bzw. zwei Minuten CO appliziert wurde. Der Strom

wurde bei einem Potential von 0 mV abgelesen und die resultierende Strom-Zeitkurve zum Zeitpunkt des Einwaschens auf 1 normiert. Aus allen normierten Kurven einer Messreihe wurden anschließend die Mittelwerte bestimmt.

Zunächst wurde das fettlösliche CORM-2 ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$) verwendet. Als Kontrolle wurde inaktives CORM-2 eingesetzt (siehe 2.3.5). Applikation von 30 μM CORM-2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude auf das 2,7-fache $\pm 0,52$ (Abb 3.9 A).

Danach wurde mit dem PhotoCORM CORM-S1 ($[\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]$) gearbeitet, welches lichtinduziert bei einer Wellenlänge von 470 nm CO freisetzt, sowie mit inaktivem CORM-S1 (siehe 2.3.5). Das Einwaschen von CORM-S1 bei eingeschalteter Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 470 nm führt zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude um $83,15 \pm 21\%$ (Abb. 3.9 B).

Da durch CORMs auch unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können, die durch Akkumulation der metallhaltigen Verbindungen nach CO-Freisetzung hervorgerufen werden und Zellschädigungen verursachen können (Winburn et al. 2012), wurde außerdem mit CO-begaster Lösung gearbeitet (siehe 2.3.5). Applikation einer CO-gesättigten Lösung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude um $25 \pm 2,6\%$ (Abb 3.9 C).

Um die verschiedenen CO-Quellen miteinander vergleichen zu können, wurden die Stromamplituden jeweils 4,5 Minuten nach dem Einwaschen des CO-Gases bzw. der CO-Donatoren evaluiert und auf die jeweiligen Kontrollbedingungen normalisiert (Abb. 3.9 D). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl CORMs, als auch CO-Gas einen aktivierenden Effekt auf den TREK-1 Kanal haben. Dabei ist die Größe der Aktivierung sehr unterschiedlich. Der stärkste aktivierende Effekt auf TREK-1 wird durch CORM-2 vermittelt, während CORM-S1 und CO-Gas einen schwächeren Effekt auf den Kanal ausüben.

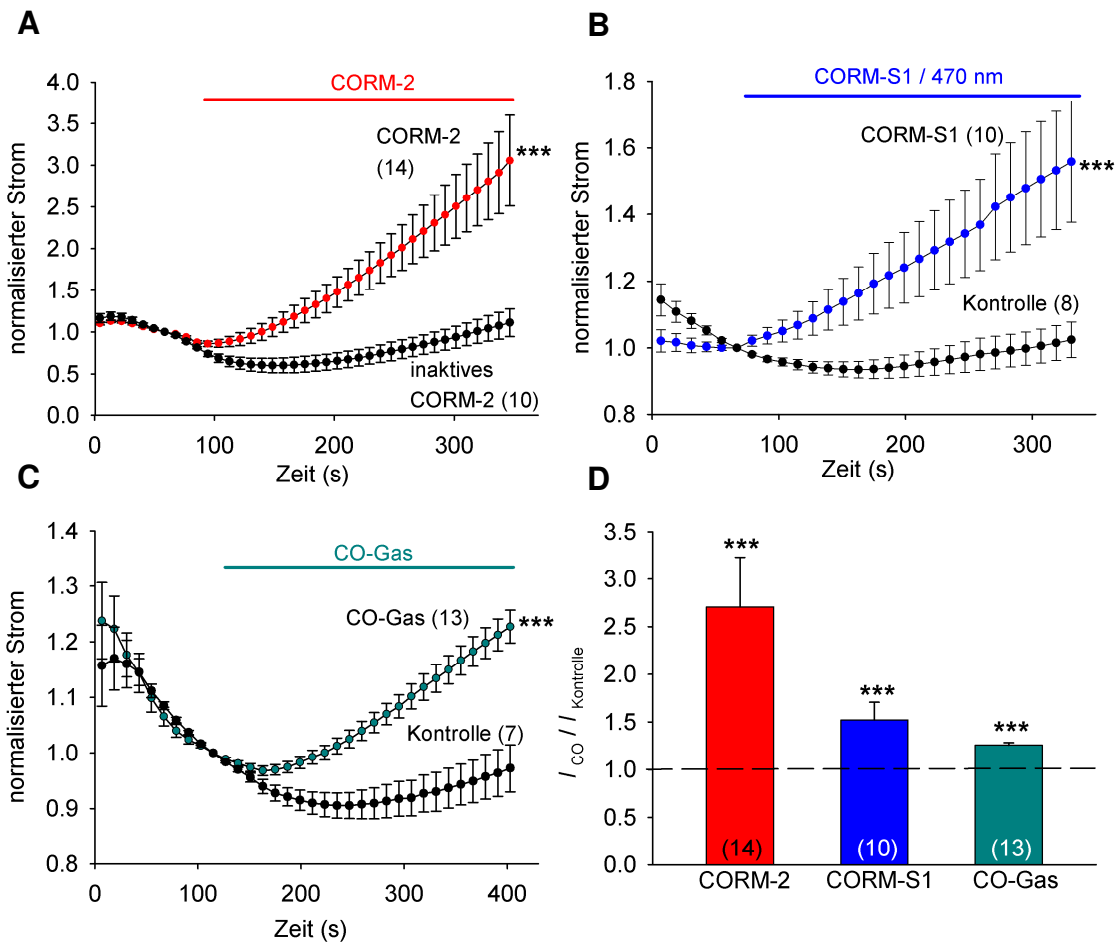


Abb. 3.9 Aktivierung von TREK-1 Kanälen in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe von CORMs und CO-Gas

(A) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude vor und nach Applikation von CORM-2 bzw. inaktivem CORM-2 in einer Konzentration von 30 μM . (B) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude vor und nach Applikation von CORM-S1 bzw. inaktivem CORM-S1 in einer Konzentration von 50 μM . Zur CO Freisetzung aus CORM-S1 wurde eine Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 470 nm genutzt. (C) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude vor und nach Perfusion mit CO-Gas. In allen Messungen wurden die Ströme mit Hilfe einer Spannungsrampe (-120 bis +40 mV, 9 s) hervorgerufen. Die Ströme wurden bei 0 mV ausgewertet und zum Zeitpunkt der Applikation auf 1 normiert. (D) Vergleich der verschiedenen CO-Donatoren. Die TREK-1 Stromamplituden wurden 4,5 min nach Zugabe der verschiedenen CO Quellen evaluiert und auf Kontrollbedingungen normiert (gestrichelte Linie). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Der Standardfehler des Mittelwerts wird angezeigt.

3.2.2 Wirkung von CO auf den TREK-1 Strom in HEK293 Zellen

Der stark aktivierende CORM-2-Effekt auf den TREK-1 Kanal in *Xenopus* Oozyten wurde weiterhin in einem Expressionssystem mit Säugetierzellen untersucht. Hierzu wurde die humane Zelllinie HEK293 verwendet. Die Zellen wurden mit TREK-1 transfiziert und in der *whole-cell*-Konfiguration mittels Patch-Clamp Technik gemessen. Zu Beginn der Messung wurde das Membranpotential auf -80 mV gehalten und eine Rampe von -120 bis + 40 mV

verwendet (siehe Abb. 2.3). Die resultierenden Ströme sind in Abb. 3.10 A dargestellt. Der typische auswärts rektifizierende TREK-1 Kaliumstrom (schwarze Kurve) wurde durch Applikation des CO-Donators CORM-2 (30 μ M) stark erhöht (rote Kurve). Um Leckströme auszuschließen, wurde der Blocker Bupivacain (3 mM) eingewaschen, der eine nahezu vollständige Inhibition des TREK-1 Stromes zeigte (blaue Kurve).

Abb. 3.10 B zeigt einen typischen Zeitverlauf des TREK-1 Stromes, ausgewertet bei 0 mV, vor und nach dem Einwaschen von CORM-2 und Bupivacain. Applikation von CORM-2 führte zu einer Aktivierung des TREK-1 Stromes, welcher durch Zugabe von Bupivacain geblockt wurde. In einer quantitativen Auswertung wurden die Stromamplituden nach Einwaschen von CORM-2 bzw. inaktivem CORM-2 bestimmt und auf die Stromamplitude vor dem Einwaschen normalisiert. CORM-2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der TREK-1 Stromamplitude um $67 \pm 10\%$, während inaktives CORM-2 keinen signifikanten Effekt auf den TREK-1 Strom ausübte (Abb. 3.10 C).

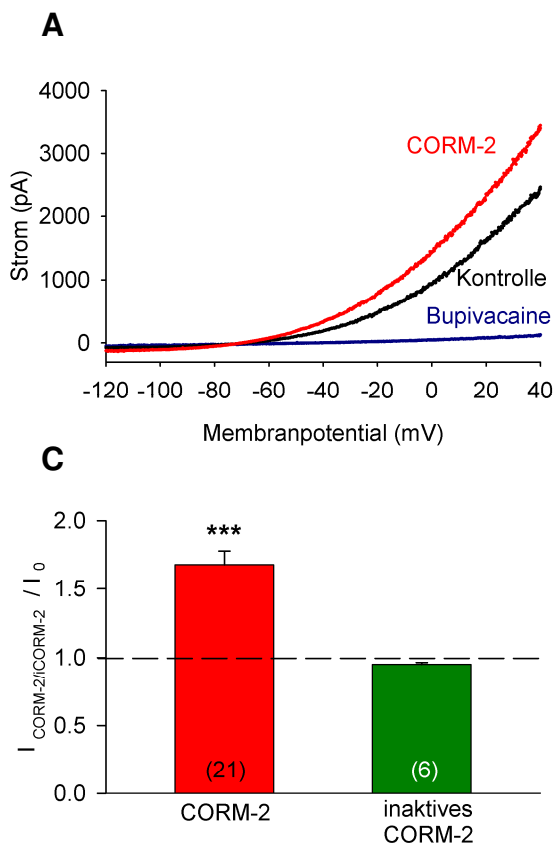


Abb. 3.10 Aktivierung von TREK-1 Kanälen in HEK293 Zellen nach Zugabe von CORM-2

(A) Strom-Spannungskurve von TREK-1 (schwarz) nach Applikation von CORM-2 [30 μ M] (rot) und dem TREK-1 Blocker Bupivacaine [3 mM] (blau). **(B)** Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude vor und nach Applikation von CORM-2 und Bupivacain. **(C)** Relative Stromamplitude von TREK-1 nach Applikation von CORM-2 und inaktivem CORM-2. Die Ströme wurden auf Kontrollbedingungen vor der Applikation normiert (gestrichelte Linie). Die Anzahl der untersuchten Zellen ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

3.2.3 Signalwege, die der Wirkung von CO zugrunde liegen könnten

Die Rolle der PKG-abhängigen Phosphorylierung von TREK-1

Kohlenstoffmonoxid (CO) reguliert eine Reihe physiologischer Prozesse und ist ein wichtiges zelluläres Signalmolekül. Es ist in der Lage mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren und diverse Signalwege zu modulieren. CO kann durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) die intrazelluläre Konzentration an zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) erhöhen und cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) aktivieren (Brüne & Ullrich 1987). Im TREK-1 ist eine PKG Phosphorylierungsstelle bekannt. Diese befindet sich bei TREK-1a im C-Terminus an Aminosäureposition 351 (im humanen TREK-1c an Position 362) und führt durch PKG-abhängige Phosphorylierung des Serinrestes zu einer Aktivierung des Kanals (Dallas, Scragg & Peers 2008; Koh et al. 2001).

Um zu untersuchen, ob die CO-vermittelte Aktivierung des TREK-1 durch die PKG vermittelt wird, wurde mittels Mutagenese das Serin durch Alanin (S362A, verhindert eine Phosphorylierung) und Aspartat (S362D, imitiert eine Phosphorylierung) ersetzt. Zunächst wurden die *Xenopus* Oozyten mit dem Wildtyp TREK-1c, TREK-1c^{S362A} und TREK-1c^{S362D} injiziert und die absoluten Ströme bei 0 mV mittels Spannungsklemme bestimmt. Beide Mutanten, TREK-1c^{S362A} ($8,63 \pm 0,6 \mu\text{A}$) TREK-1c^{S362D} ($4,26 \pm 0,4 \mu\text{A}$), produzierten signifikant mehr Strom als der Wildtyp ($2,98 \pm 0,2 \mu\text{A}$) (Abb. 3.11 A). Anschließend wurden Wildtyp (WT) TREK-1c und beide S362 Mutanten mit CORM-2 und als Kontrolle mit inaktivem CORM-2 behandelt. Die Strommessungen wurden, wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Zugabe von CORM-2 führte in TREK-1c^{S362A} zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude um den Faktor $4,26 \pm 0,78$ vergleichbar mit dem TREK-1c WT ($4,29 \pm 0,65$) (Abb. 3.11 B). Der TREK-1c^{S362D} Strom wurde durch CORM-2 noch etwas stärker erhöht (um den Faktor $5,67 \pm 0,68$). Beim Wildtyp ergab sich eine etwas geringere Zunahme des Stromes nach Zugabe von CORM-2 (Abb. 3.11 B).

Die gleichen Untersuchungen wurden auch in HEK293 Zellen mittels Patch-Clamp-Messungen durchgeführt. Die mit Wildtyp TREK-1c, TREK-1c^{S362A} und TREK-1c^{S362D} transfizierten HEK293 Zellen wurden, wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, untersucht.

Die absoluten Ströme beider Mutanten, TREK-1c^{S362A} (545,77 ± 175 pA) TREK-1c^{S362D} (1129,55 ± 220 pA), zeigten in HEK293 Zellen keine signifikante Veränderung der Stromamplitude verglichen mit dem Wildtyp (930,02 ± 156 pA) (Abb. 3.11 C). Die Applikation von CORM-2 führte in beiden Mutanten zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude. Der Strom von TREK-1c^{S362A} wurde um 87 ± 10% und der Strom von TREK-1c^{S362D} um den Faktor 2,09 ± 0,06 vergleichbar mit dem TREK-1c WT (67 ± 10%) erhöht (Abb. 3.11 D). Zusammengefasst lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der CO-Effekt in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen nicht durch die PKG Phosphorylierungsstelle S362 vermittelt wird.

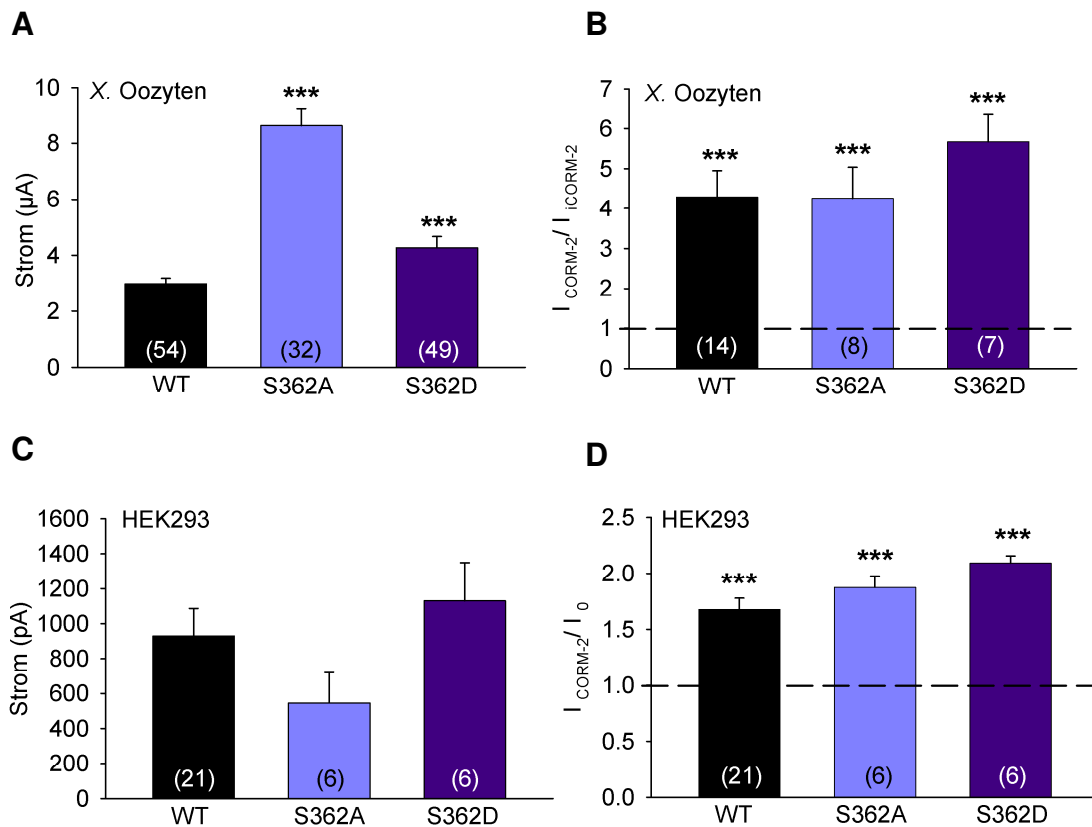


Abb. 3.11 Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c^{S362A} und TREK-1c^{S362D} in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen nach Zugabe des CO-Donators CORM-2

(A) Absolute Stromamplituden von TREK-1 WT, TREK-1^{S362A} und TREK-1^{S362D} in *Xenopus* Oozyten. (B) Relative Stromamplituden von TREK-1 WT, TREK-1^{S362A} und TREK-1^{S362D} nach Applikation von CORM-2 [30 µM] in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert, jeweils 4,5 min nach Zugabe ausgewertet und auf Strommessungen mit inaktivem CORM-2 normalisiert (gestrichelte Linie). (C) Absolute Stromamplitude von TREK-1 WT, TREK-1^{S362A} und TREK-1^{S362D} in HEK293 Zellen. (D) Relative Stromamplitude von TREK-1 WT, TREK-1^{S362A} und TREK-1^{S362D} nach Applikation von CORM-2 in HEK293 Zellen. Die Stromamplituden wurden auf Kontrollbedingungen vor der Applikation normiert (gestrichelte Linie). TREK-1 WT (schwarz), TREK-1^{S362A} (blau) und TREK-1^{S362D} (violett). Die Anzahl der gemessenen Oozyten bzw. Zellen ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Untersuchung eines ROS-abhängigen Signalweges und die Wirkung von CO

Es ist bekannt, dass CO auch durch Bindung an die Cytochrom-c-Oxidase zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen kann (Zuckerbraun et al. 2007). Physiologische Wirkorte für ROS sind vor allem Cysteine, da diese Aminosäure eine funktionelle Thiolgruppe in der Seitenkette besitzt, die sehr oxidationsempfindlich ist (Miki & Funato 2012).

Im Carboxyterminus des TREK-1 befinden sich zwei Cysteine. Es wurde nun untersucht, ob diese Cysteinreste in den CO-Signalweg involviert sind.

Durch Mutagenese wurden die Cysteine an Aminosäurepositionen 376 und 410 im TREK-1c durch Serin (neutral und gleiche Größe, vgl. (Scragg et al. 2008)) ersetzt. Nach Injektion von Wildtyp (WT) TREK-1c, TREK-1c^{C376S} und TREK-1c^{C376S} cRNA in gleichen Mengen in *Xenopus* Oozyten wurden zunächst die absoluten Ströme bei 0 mV gemessen. Beide Mutanten, TREK-1c^{C376S} ($2 \pm 0,22 \mu\text{A}$) und TREK-1c^{C410S} ($2,03 \pm 0,14 \mu\text{A}$), zeigten keine signifikante Veränderung der Stromamplitude verglichen mit dem WT ($2,22 \pm 0,22 \mu\text{A}$) (Abb. 3.12 A). Anschließend wurde der TREK-1c Kanal und beide Cysteinmutanten mit CORM-2 und inaktivem CORM-2 inkubiert und die Ströme wurden, wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, gemessen und ausgewertet. Zugabe von CORM-2 führte in TREK-1c^{C376S} und TREK-1c^{C410S} zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude um den Faktor 2, vergleichbar mit dem WT TREK-1c (Abb. 3.12 B).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der CO-Effekt nicht über die carboxyterminalen Cysteinreste vermittelt wird.

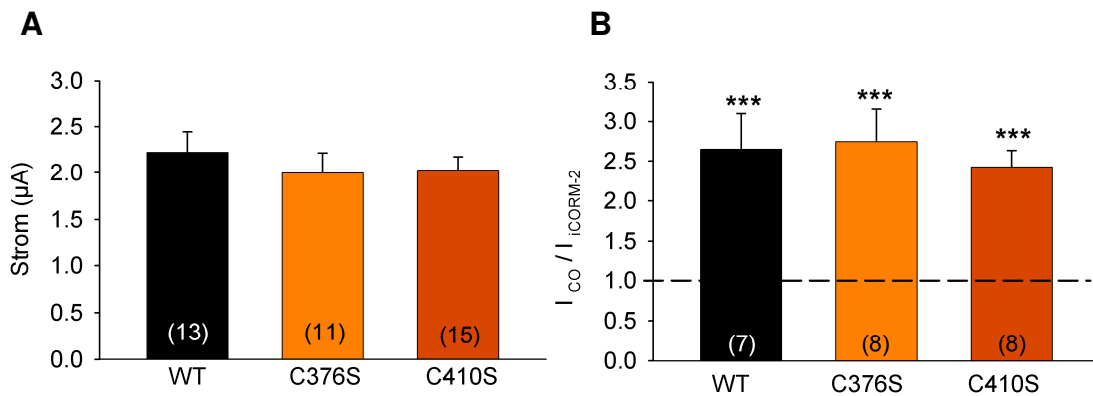


Abb. 3.12 Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c^{C376S} und TREK-1c^{C410S} in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe des CO-Donators CORM-2

(A) Absolute Stromamplituden von TREK-1c WT, TREK-1c^{C376S} und TREK-1c^{C410S} in *Xenopus* Oozyten. (B) Relative Stromamplituden von TREK-1 WT, TREK-1^{C376S} und TREK-1^{C410S} nach Applikation von CORM-2 [30 µM] in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert, jeweils 4,5 min nach Zugabe ausgewertet und auf Strommessungen mit inaktivem CORM-2 normalisiert (gestrichelte Linie). TREK-1 WT (schwarz), TREK-1^{C376S} (orange) und TREK-1^{C410S} (braun). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

Untersuchungen der PKA-abhängigen TREK-1 Phosphorylierungsstelle in *Xenopus* Oozyten

Weiterhin ist bekannt, dass CO Kinasen, wie z.B. die MAP-Kinase (MAPK), regulieren kann (Kim, Ryter & Choi 2006; Otterbein et al. 2000; Boczkowski, Poderoso & Motterlini 2006). Im Carboxyterminus von TREK-1 sind weitere Phosphorylierungsstellen beschrieben. Serin an Position 333 (im humanen TREK-1c an Position 344) wird in der Literatur als Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A (PKA) beschrieben; Phosphorylierung führt zu einer Inhibition des Kanals (Patel et al. 1998).

Zunächst wurde mit Hilfe des PKA-Inhibitors H89 (20 µM) überprüft, ob der TREK-1 Kanal tatsächlich an Position S344 durch die PKA reguliert wird. Durch Mutagenese wurde das Serin durch Alanin (S344A, verhindert eine Phosphorylierung) oder Aspartat (S344D, imitiert eine Phosphorylierung) ersetzt und anschließend cRNAs in *Xenopus* Oozyten injiziert. In Abb. 3.13 A ist ein typischer Zeitverlauf des TREK-1c Stromes (WT), ausgewertet bei 0 mV, nach dem Einwaschen des PKA Inhibitors H89 dargestellt. Applikation von H89 führte zu einer Zunahme des TREK-1c Stromes. Das Auswaschen der Substanz führte zunächst zu einem kurzen, schnellen Anstieg und im weiteren Verlauf zum Abfall des Stromes (Abb.3.13 A). Im Gegensatz dazu wurden die Mutanten

TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} durch Applikation von H89 inhibiert (Abb. 3.13 B und C). In einer quantitativen Auswertung wurden die Stromamplituden 3 min nach Einwaschen von H89 bestimmt und auf die Stromamplitude vor dem Einwaschen normalisiert. H89 bewirkte eine signifikante Erhöhung der TREK-1c Stromamplitude um $50 \pm 9,8\%$, während die Stromamplituden der S344 Mutanten (TREK-1c^{S344A} ($7 \pm 9\%$) und TREK-1c^{S344D} ($23 \pm 10\%$) (Abb. 3.13 D)) reduziert wurden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der TREK-1c Kanal über Serin an Position 344 durch die PKA reguliert werden kann.

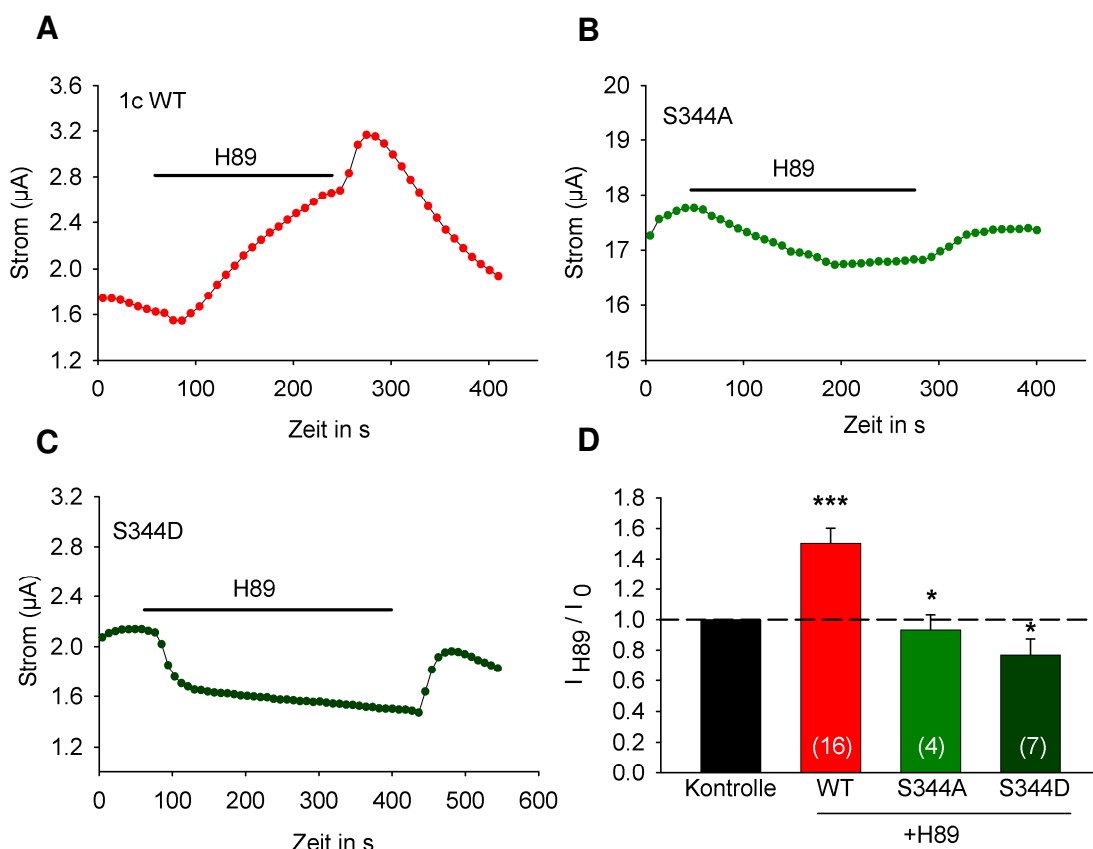


Abb. 3.13 Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe des PKA-Inhibitors H89

Zeitverläufe der TREK-1c (**A**), TREK-1c^{S344A} (**B**) und TREK-1c^{S344D} (**C**) Stromamplituden vor und nach Applikation von 20 μM H89. Alle Ströme wurden bei 0 mV ausgewertet. (**D**) Relative Stromamplitude von TREK-1 nach Applikation von 20 μM H89. Die Ströme wurden auf Kontrollbedingungen vor der Applikation normiert (gestrichelte Linie). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

Wirkung von CO auf die PKA-abhängige TREK-1 Phosphorylierungsstelle

Als nächstes wurde untersucht, ob der CO-Effekt durch die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle S344 vermittelt wird. Dazu wurden TREK-1c, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} cRNAs in gleichen Mengen in *Xenopus* Oozyten injiziert und die absoluten Ströme bei 0 mV gemessen. Die Mutante TREK-1c^{S344A}, welche einen dephosphorylierten Zustand des Kanals nachahmt, zeigte einen Strom von $21,56 \pm 1,21 \mu\text{A}$ und ist 7-fach größer als der TREK-1c (WT) ($2,98 \pm 0,2 \mu\text{A}$). Die TREK-1c^{S344D} Mutante, die den phosphorylierten Zustand des Kanals imitiert, zeigte einen absoluten Strom von $2,14 \pm 0,17 \mu\text{A}$ und war nicht signifikant unterschiedlich zum WT (Abb. 3.14 A). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass in *Xenopus* Oozyten TREK-1c an Position 344 überwiegend phosphoryliert ist. Anschließend wurde TREK-1 und beide S344 Mutanten mit CORM-2 und als Kontrolle mit inaktivem CORM-2 gemessen. Die Strommessungen wurden, wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Zugabe von CORM-2 führte in beiden S344 Mutanten zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude (TREK-1^{S344A} ($56 \pm 5\%$) und TREK-1c^{S344D} ($65 \pm 31\%$), allerdings ist dieser aktivierende Effekt relativ schwach im Vergleich zum WT (Abb. 3.14 B).

Vergleichbare Untersuchungen wurden in HEK293 Zellen mit der Patch-Clamp Technik durchgeführt. Die transfizierten HEK293 Zellen (TREK-1c, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D}) wurden, wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, gemessen. Der absolute Strom von TREK-1c^{S344A} ($1191,32 \pm 382 \text{ pA}$) war signifikant unterschiedlich zum WT ($930,02 \pm 155,71 \text{ pA}$). TREK-1c^{S344D} ($198,8 \pm 39,2 \text{ pA}$) hatte dagegen eine signifikant kleinere Stromamplitude als der Wildtyp (Abb. 3.14 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in HEK293 Zellen TREK-1c an Position 344 überwiegend dephosphoryliert ist. Die Applikation von CORM-2 führte in beiden Mutanten zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude. Die Stromamplitude von TREK-1c^{S344A} ($73 \pm 10\%$) war ähnlich stark erhöht wie beim WT, während beim TREK-1c^{S344D} eine noch stärkere Zunahme des Stromes (um den Faktor $2,38 \pm 0,2$) beobachtet wurde (Abb. 3.14 D).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Phosphorylierungsstatus des TREK-1c in beiden Expressionssystemen sehr unterschiedlich ist. Während TREK-1c in *Xenopus* Oozyten wahrscheinlich stark phosphoryliert

vorliegt, befindet er sich in HEK293 Zellen verstärkt im dephosphorylierten Zustand. Auch die CO-abhängige Aktivierung der S344 Mutanten verglichen mit dem WT zeigen in beiden Expressionssystemen unterschiedliche Ergebnisse. Es trat in beiden Expressionssystemen eine signifikante Aktivierung nach Zugabe von CORM-2 in beiden S344 Mutanten auf, allerdings von unterschiedlicher Stärke. Ob S344 in Oozyten an einer CO-abhängigen Aktivierung des Kanals beteiligt ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Dazu müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

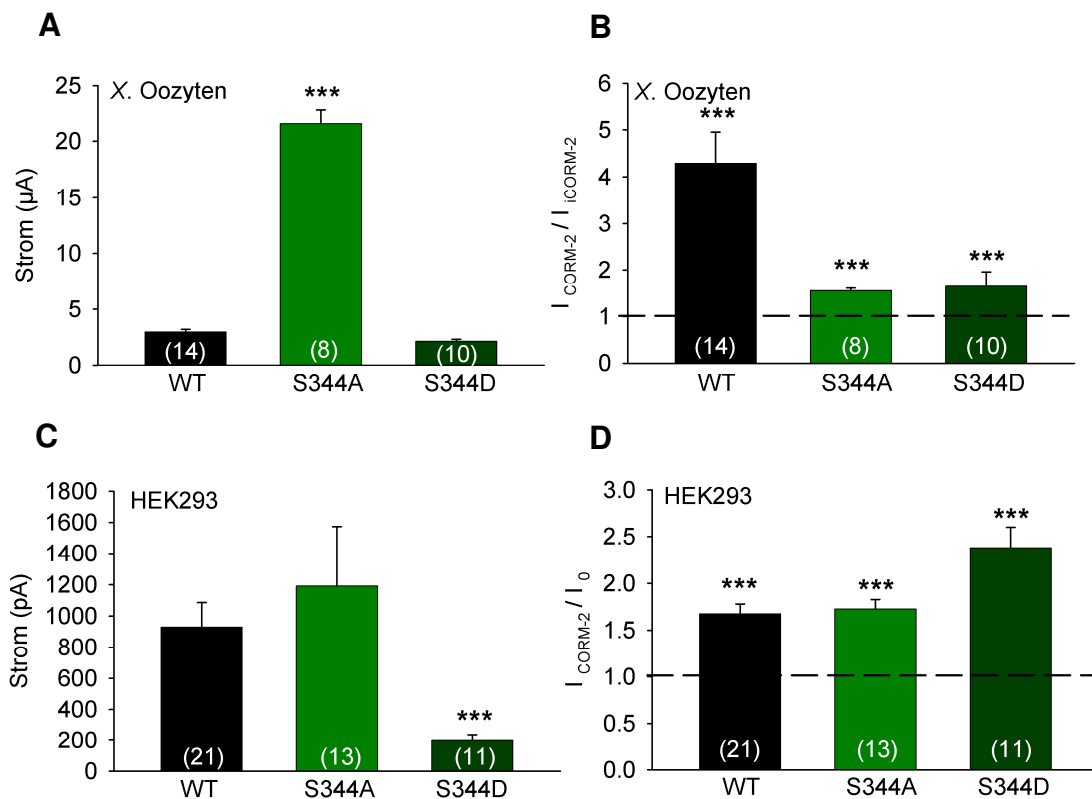


Abb. 3.14 Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen nach Zugabe des CO-Donators CORM-2

(A) Absolute Stromamplituden von TREK-1c WT, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} in *Xenopus* Oozyten. (B) Relative Stromamplituden von TREK-1c WT, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} nach Applikation von CORM-2 [30 μM] in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert, jeweils 4,5 min nach Zugabe ausgewertet und auf Strommessungen mit inaktivem CORM-2 normalisiert (gestrichelte Linie). (C) Absolute Stromamplitude von TREK-1c WT, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} in HEK293 Zellen. (D) Relative Stromamplituden von TREK-1c WT, TREK-1c^{S344A} und TREK-1c^{S344D} nach Applikation von CORM-2 in HEK293 Zellen. Die Stromamplituden wurden auf Kontrollbedingungen vor der Applikation normiert (gestrichelte Linie). TREK-1c WT (schwarz), TREK-1c^{S344A} (grün) und TREK-1c^{S344D} (dunkelgrün). Die Anzahl der gemessenen Oozyten bzw. Zellen ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

Wirkung von CO auf die Deletionsmutanten TREK-1^{ΔNT} und TREK-1^{ΔCT}

Um genauer zu untersuchen, ob die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle und weitere mögliche Phosphorylierungsstellen im Carboxyterminus (CT) des TREK-1 Kanals an der CO-abhängigen Aktivierung des Kanals in *Xenopus* Oozyten beteiligt sind, wurde der CT an Aminosäureposition 334 mittels Mutagenese durch Einführung eines Stoppcodons trunkiert (TREK-1c^{ΔCT}) (Kennard et al. 2005; Veale et al. 2014). Außerdem wurde untersucht, ob der Aminoterminal (NT) des Kanals an der CO-abhängigen Vermittlung des Effekts beteiligt ist. Hierfür wurde die verkürzte ATI (alternative Translationsinitiation)-Isoform verwendet (siehe 1.3.1). Mittels Mutagenese wurden die ersten beiden Methionine an Aminosäureposition 1 und 2 mutiert, so dass die Translation ausschließlich am Basentriplett AUG beginnen konnte, das im TREK-1c für Methionin an Aminosäureposition 53 codiert (TREK-1^{ΔNT}). Als Kontrolle wurde ein TREK-1 Konstrukt verwendet, welches durch Einführung eines Stoppcodons an Aminosäureposition 303 zu einem funktionell inaktiven Kanal führt (TREK-1c^{inaktiv}).

Nach Injektion von TREK-1c, TREK-1c^{ΔCT}, TREK-1c^{ΔNT} und TREK-1c^{inaktiv} cRNA in gleichen Mengen in *Xenopus* Oozyten wurden zunächst die absoluten Ströme bei 0 mV ausgewertet und verglichen. Beide Trunkierungen führten zu stark reduzierten TREK-1 Stromamplituden (TREK-1c^{ΔCT} $0,34 \pm 0,02 \mu\text{A}$; TREK-1c^{ΔNT} $0,37 \pm 0,05 \mu\text{A}$) im Vergleich zum Wildtyp ($2,67 \pm 0,18 \mu\text{A}$) (Abb. 3.15 A), während das inaktive TREK-1 Konstrukt keinen TREK-1 Strom mehr zeigte (TREK-1c^{inaktiv} $0,09 \pm 0,0062 \mu\text{A}$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl der CT als auch der NT eine große Rolle bei der Regulation des Kanals spielen.

Anschließend wurden die Ströme der Verkürzungsmutanten (TREK-1c^{ΔNT} und TREK-1c^{ΔCT}) wie unter 3.2.1 beschrieben nach Einwaschen von CORM-2 und inaktivem CORM-2 gemessen. Applikation von CORM-2 führte in beiden Trunkierungsmutanten zu einer signifikanten 3-fachen Erhöhung der Stromamplitude und ist damit vergleichbar mit der CO-abhängigen Aktivierung des TREK-1c WT (Abb. 3.15 B). Um auszuschließen, dass endogene Ströme in den *Xenopus* Oozyten durch CORM-2 aktiviert werden und damit die Wirkung von CORM-2 auf TREK-1 Konstrukte mit einem geringen Grundstrom verfälschen können, wurde als Kontrolle TREK-1^{inaktiv} ebenfalls mit CORM-2

und inaktivem CORM-2 gemessen. Die Ergebnisse zeigten keine signifikante Veränderung der endogenen Ströme in *Xenopus* Oozyten (Abb 3.15 B).

Sowohl der NT als auch der CT ab Aminosäureposition 333 und somit auch die Phosphorylierungsstellen (S344 und S362) in diesem Bereich scheinen nicht an einer CO-abhängigen Aktivierung des Kanals beteiligt zu sein.

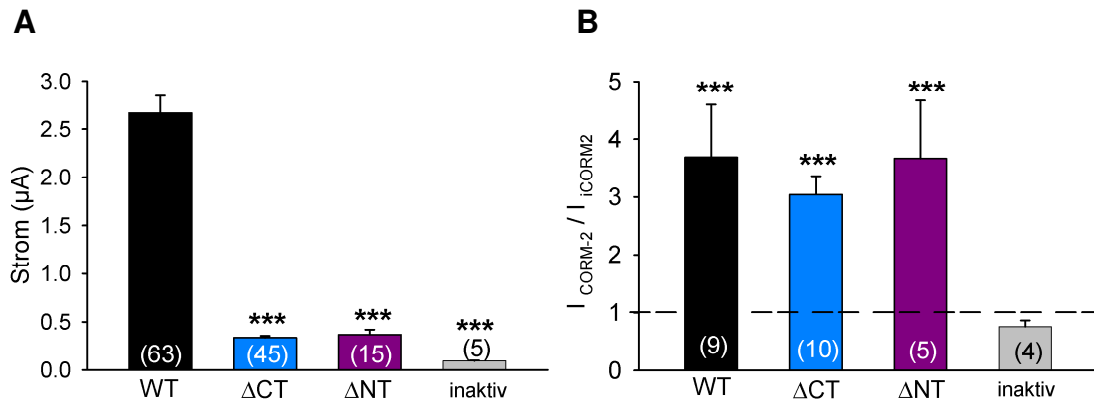


Abb. 3.15 Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c^{ΔCT}, TREK-1c^{ΔNT} und TREK-1c^{inaktiv} in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe des CO-Donators CORM-2

(A) Absolute Stromamplituden von TREK-1c WT, TREK-1c^{ΔCT}, TREK-1c^{ΔNT} und TREK-1c^{inaktiv} in *Xenopus* Oozyten. (B) Relative Stromamplituden von TREK-1c WT, TREK-1c^{ΔCT}, TREK-1c^{ΔNT} und TREK-1c^{inaktiv} nach Applikation von CORM-2 [30 µM] in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert, jeweils 4,5 min nach Zugabe ausgewertet und auf Strommessungen mit inaktivem CORM-2 normalisiert (gestrichelte Linie). TREK-1 WT (schwarz), TREK-1c^{ΔCT} (blau), TREK-1c^{ΔNT} (violett) und TREK-1c^{inaktiv} (grau). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

3.3 Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) auf TREK-1

Um die bisherigen negativen Ergebnisse mit CO abzusichern, wurden weitere Untersuchungen mit dem gasförmigen Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) als Positivkontrolle durchgeführt. NO bindet ebenfalls an die lösliche Guanylatzyklase und führt so zu einer Aktivierung des Enzyms. Dies führt zu einem erhöhten zytosolischen cGMP-Spiegel und zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Wie bereits unter 3.2.5 beschrieben, befindet sich die PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle Serin an Aminosäureposition 362 im C-Terminus des TREK-1c (Koh et. al 2001).

Nach Injektion der TREK-1 cRNA in Oozyten wurden elektrophysiologische Messungen in *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Als NO-Donator wurde ein Gemisch aus SNP (1 mM) und DTT (2 mM) verwendet (siehe 2.3.5). In Abb. 3.16 A ist eine typische Strom-Spannungskurve des TREK-1 Stromes vor

(schwarze Kurve) und nach Applikation des NO-Donators (violette Kurve) dargestellt. Die Applikation von NO führte zu einer Erhöhung der TREK-1 Stromamplitude um $72 \pm 7\%$ (Abb. 3.16 C). Eine Messung pro Oozyte dauerte jeweils 3,5 Minuten, wobei nach einer Minute NO bzw. Kontrolllösung appliziert wurde. Der Strom wurde bei 0 mV abgelesen und die resultierende Strom-Zeitkurve zum Zeitpunkt des Einwaschens auf 1 normiert. Aus allen normierten Kurven einer Messreihe wurden anschließend die Mittelwerte bestimmt (Abb 3.16 B). Weiterhin wurden die Mutanten TREK-1c^{S362D} und TREK-1c^{S344D} mit NO inkubiert. Die Mutante S362D zeigte keine signifikante Erhöhung nach Zugabe von NO (Abb. 3.16 C), während die Mutante S344D eine starke Aktivierung auf das 2,8-fache nach Applikation von NO zeigte und damit durch NO stärker aktivierbar war als der Wildtyp ($72 \pm 7\%$). Die Trunkierungsmutante TREK-1^{ΔCT} wies keine signifikante Aktivierung nach Zugabe des NO-Donators auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass der NO-Effekt über den CT vermittelt wird, und zwar über die PKG-Phosphorylierungsstelle S362. Die PKA-Phosphorylierungsstelle S344 scheint nicht an einer NO-abhängigen Aktivierung des Kanals beteiligt zu sein. Außerdem lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die CO-abhängige Aktivierung des Kanals auf anderen Mechanismen beruht als die NO-abhängige Aktivierung.

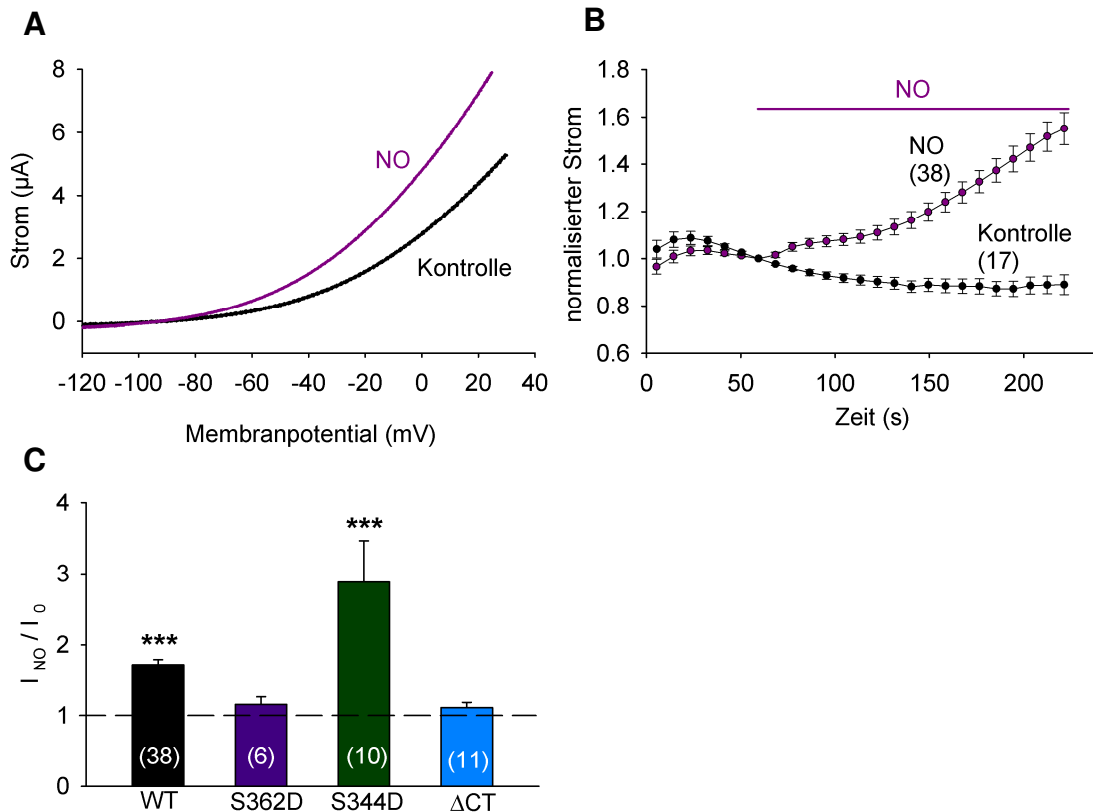


Abb. 3.16 Einfluss von NO auf TREK-1-Kanäle und TREK-1-Mutanten

(A) Strom-Spannungskurve von TREK-1 (schwarz) und nach Applikation von NO (SNP+DTT) (violett). (B) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude vor und nach Applikation von NO (SNP+DTT). Die Ströme wurden bei 0 mV ausgewertet und zum Zeitpunkt der Applikation auf 1 normiert. (C) Relative Stromamplitude von TREK-1c und den Mutanten TREK-1c^{S362D}, TREK-1c^{S344D} und TREK-1c ^{ΔCT} nach Applikation von NO. Die Ströme wurden zum Zeitpunkt der Applikation auf 1 normiert und 2,5 min nach der Applikation von NO dargestellt. Die Ströme wurden auf Kontrollbedingungen normiert (gestrichelte Linie). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

3.4 Direkte CO-Wirkung auf den TREK-1 Kanal

3.4.1 Giant-Patch Messungen von TREK-1 nach Zugabe von CO

Die bisher vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der CO-Effekt unabhängig von Phosphorylierungsstellen im CT und NT ist und durch andere Mechanismen als der NO-Effekt vermittelt wird. Im nächsten Schritt wurden *inside-out* Messungen an Giant-Patches durchgeführt, mit dem Ziel den CO-Effekt am TREK-1 Kanal in Abwesenheit von Kinaseaktivitäten oder intrazellulären sekundären Botenstoffen zu untersuchen.

Die Messungen wurden wie in 2.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Applikation des CO-Donators CORM-2 auf der intrazellulären Seite führte zu einer

Zunahme des TREK-1 Stromes. Der TREK-1 Strom konnte durch Zugabe K_{2P} -Kanal Blockers Tetrapentylammonium (TPA, 1 mM) vollständig blockiert werden (Abb. 3.17 A). TREK-1 zeigte unter diesen experimentellen Bedingungen einen typischen Anstieg des Stromes über die Zeit (einen sogenannten *run-up*), deshalb wurde mittels Extrapolation der Anstieg der Grundlinie bestimmt (Abb. 3.17 B, gestrichelte Linie). Eine Zugabe von CORM-2 führte, verglichen mit der extrapolierten Grundlinie, zu einer Zunahme des TREK-1 Stromes. Die nahezu vollständige Hemmung durch TPA zeigte, dass es sich tatsächlich um einen Kaliumstrom und nicht etwa um ein Leck handelt (Abb. 3.17 B). Als Kontrolle wurden die gleichen Messungen mit inaktivem CORM-2 durchgeführt. Auch in diesen Messungen war der typische *run-up* zu beobachten, welcher ebenfalls mittels Extrapolation dargestellt wurde (Abb. 3.17 D, gestrichelte Linie). Nach Zugabe von inaktivem CORM-2 war keine Aktivierung, verglichen mit der extrapolierten Grundlinie, zu beobachten. Die Zugabe von TPA führte auch in den Kontrollmessungen zu einem vollständigen Block des TREK-1 Stromes und zeigte, dass Leckströme vernachlässigbar klein waren (Abb. 3.17 D). Anschließend wurden die Messungen quantitativ ausgewertet. Hierzu wurden die Stromamplituden 1 min nach dem Einwaschen von CORM-2 bzw. inaktivem CORM-2 bestimmt und auf die Stromamplituden direkt vor dem Einwaschen normalisiert. CORM-2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der TREK-1 Stromamplitude um $46 \pm 10\%$, während inaktives CORM-2 keine signifikante Wirkung auf den TREK-1 Strom hatte (Abb. 3.17 D).

Die Ergebnisse zeigen, dass der CO-Donator CORM-2 den TREK-1 Strom direkt und in Abwesenheit von intrazellulären Signalwegen aktivieren kann.

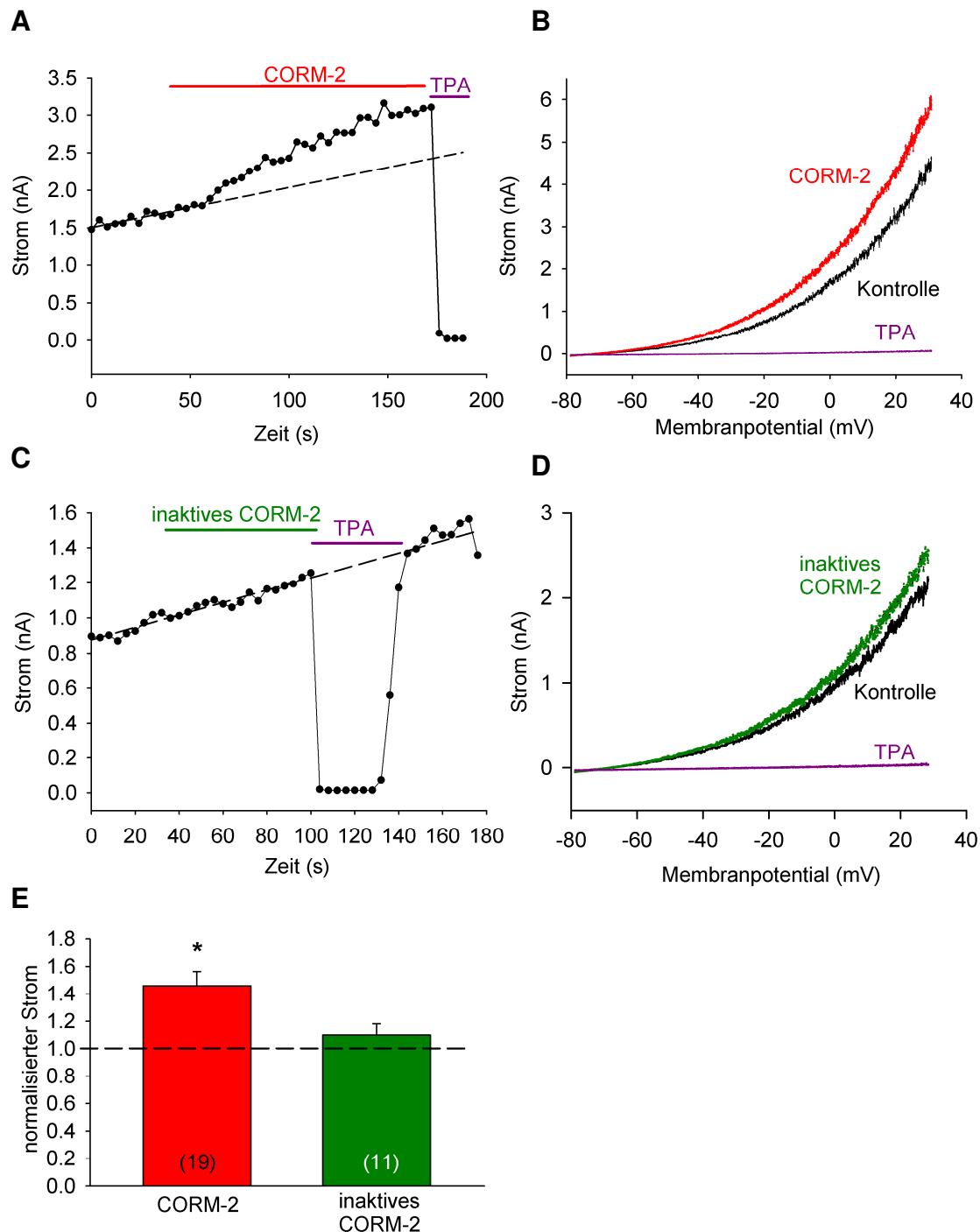


Abb. 3.17 Giant-Patch Messungen von TREK-1 Kanälen in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe von CORM-2

(A) Strom-Spannungskurve von TREK-1 (schwarz) nach Applikation von CORM-2 [30 μ M] (rot) und dem TREK-1 Blocker TPA [1 mM] (violett). (B) Zeitverlauf des TREK-1 Stromes bei 0 mV in inside-out Messungen nach Applikation von CORM-2 [30 μ M] und dem TREK-1 Blocker TPA [1 mM]. Die Stromänderungen vor der Applikation wurden durch Extrapolation bestimmt (gestrichelte Linie). (C) Strom-Spannungskurve von TREK-1 (schwarz) nach Applikation von inaktivem CORM-2 [30 μ M] (grün) und dem TREK-1 Blocker TPA [1 mM] (violett). (D) Zeitverlauf der TREK-1 Stromamplitude bei 0 mV nach Applikation von inaktivem CORM-2 [30 μ M] und dem TREK-1 Blocker TPA [1 mM]. Die Stromänderungen vor der Applikation wurden durch Extrapolation bestimmt (gestrichelte Linie). (E) Relative Stromamplitude von TREK-1 nach Applikation von CORM-2 und inaktivem CORM-2. Die Ströme wurden auf Kontrollbedingungen vor der Applikation normiert. Die Anzahl der Messungen ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

3.4.2 Wirkung von CO auf weitere Cysteine im TREK-1 Kanal

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die CO-abhängige Aktivierung des TREK-1 Kanals vermutlich direkt vermittelt wird. Ein weiterer Kanal, der ebenfalls direkt durch CO aktiviert werden kann, ist der BK-Kanal. Bei diesem Kanal wird der CO-Effekt durch Calcium vermittelt; ein Cystein an Aminosäureposition 911 ist entscheidend für diese Aktivierung (Telezhkin et al. 2011). Nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass die Cysteine im CT des TREK-1 keine Rolle bei der CO-abhängigen Aktivierung spielen (siehe 3.2.3), wurden nun weitere Cysteinreste untersucht, die zentral im Kanalprotein lokalisiert sind. Mittels Mutagenese wurden die Cysteine an den Aminosäurepositionen 104, 170 und 230 in TREK-1c durch Alanin ersetzt (Abb. 3.18 A). Nach Injektion von Wildtyp TREK-1c, TREK-1c^{C104A}, TREK-1c^{C170A} und TREK-1c^{C230A} cRNAs in gleichen Mengen in *Xenopus* Oozyten wurden zunächst die absoluten Ströme bei 0 mV gemessen. Die Mutanten TREK-1c^{C104A} ($1,93 \pm 0,18 \mu\text{A}$) und TREK-1c^{C170A} ($1,74 \pm 0,18 \mu\text{A}$) zeigten keine signifikant veränderte Stromamplitude verglichen mit dem Wildtyp ($2,13 \pm 0,22 \mu\text{A}$), während die Mutante TREK-1c^{C230A} ($6,69 \pm 0,66 \mu\text{A}$) eine signifikante starke Erhöhung der Stromamplitude zeigte (Abb. 3.18 B).

Anschließend wurden TREK-1c und die drei Cysteinmutanten mit CORM-2 und inaktivem CORM-2 behandelt und die Strommessungen, wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Applikation von CORM-2 führte bei allen drei Cysteinmutanten zu signifikanten Erhöhungen (mehr als das 3-fache) der Stromamplitude, vergleichbar mit TREK-1c WT (Abb. 3.18 C).

Die Ergebnisse zeigen, dass der direkte CO-Effekt nicht über die Cysteinreste C104, C170 und C230 vermittelt wird.

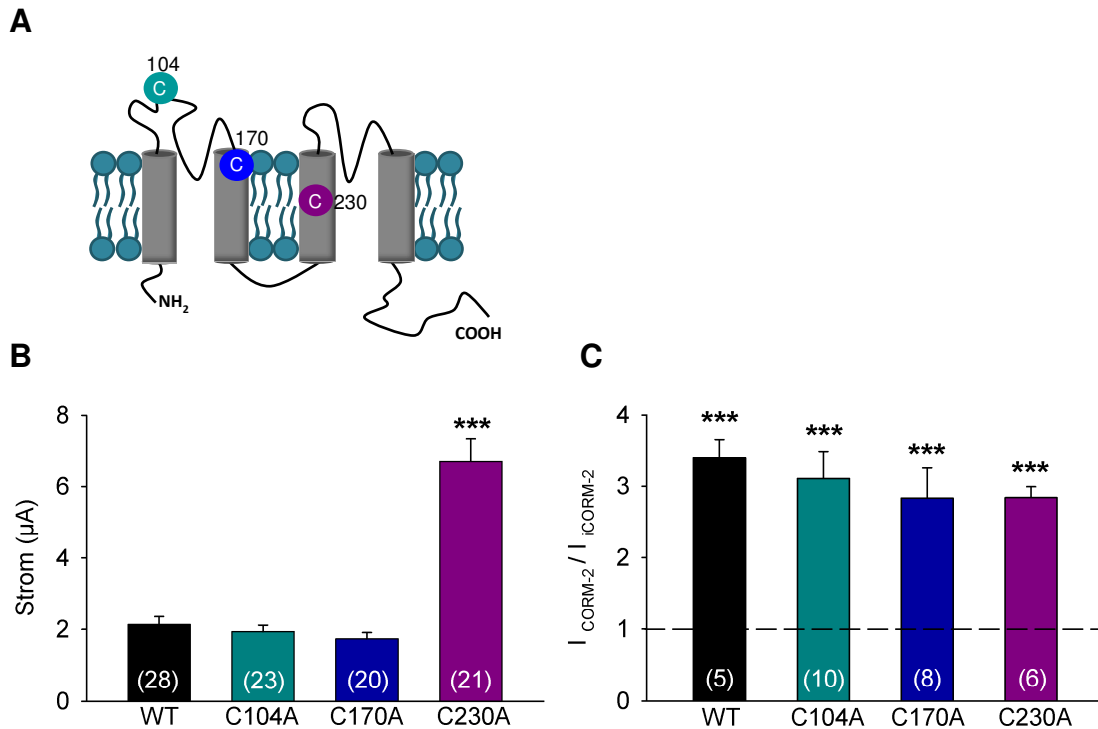


Abb. 3.18 Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c^{C104A}, TREK-1c^{C170A} und TREK-1c^{C230A} in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe des CO-Donators CORM-2

(A) Membrantopolgie TREK-1 Kanalproteins und Lage der Cysteine C104, C170 und C230. **(B)** Absolute Stromamplitude von TREK-1c WT, TREK-1c^{C104A}, TREK-1c^{C170A} und TREK-1c^{C230A} in *Xenopus* Oozyten. **(C)** Relative Stromamplitude von TREK-1 WT, TREK-1c^{C104A}, TREK-1c^{C170A} und TREK-1c^{C230A} nach Applikation von CORM-2 [30 µM] in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert, jeweils 4,5 min nach Zugabe ausgewertet und auf Strommessungen mit inaktivem CORM-2 normalisiert (gestrichelte Linie). TREK-1c WT (schwarz), TREK-1c^{C104A} (türkis), TREK-1c^{C170A} (blau) und TREK-1c^{C230A} (violett). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

3.5 Wirkung von CO auf andere Kaliumkanäle

Durch die Beeinflussung verschiedener Signalwege ist CO ein wichtiger Regulator von Ionenkanälen (Peers et al. 2014). In den letzten Jahren konnten eine Reihe CO-sensitiver Kanäle identifiziert werden (siehe 1.4.3). Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob noch weitere K_{2P}-Kanäle durch CO reguliert werden können. Zunächst wurden die Kanäle TREK-2 und TRAAK untersucht, welche ebenfalls zur Subfamilie der mechanosensitiven K_{2P}-Kanäle gehören (siehe 1.2). Nach Injektion von TREK-1, TREK-2 und TRAAK cRNAs in *Xenopus* Oozyten wurden die Messungen wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Zugabe des CO-Donators CORM-2 bewirkte sowohl bei TREK-2 als auch bei TRAAK eine 3-4-fache Steigerung der Stromamplitude.

Der aktivierende CO-Effekt war vergleichbar mit dem auf TREK-1 (Abb. 3.19, rot).

Zusätzlich wurden die K_{2P} -Kanäle TASK-1 und TASK-3, welche zur Subfamilie der säuresensitiven Kanäle gehören, untersucht (siehe 1.2). Die Stromamplitude beider Kanäle wurde nach Zugabe von CORM-2 in unterschiedlichem Maße reduziert. Während der TASK-3 Strom durch Applikation von CORM-2 auf $33 \pm 2\%$ reduziert wurde, wurde die Stromamplitude des TASK-1 auf $78 \pm 1,7\%$ reduziert (Abb. 3.19, grün).

Untersuchungen an THIK-1 und an dem einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal Kir2.1 (siehe 1.1) zeigten nach Zugabe von CORM-2 keine signifikanten Veränderungen in ihren Stromamplituden (THIK-1 ($96 \pm 6\%$) und Kir2.1 ($96 \pm 1,5\%$)) (Abb. 3.19, blau).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass CO einen spezifischen aktivierenden Effekt auf die mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle TREK-1, TREK-2 und TRAAK hat.

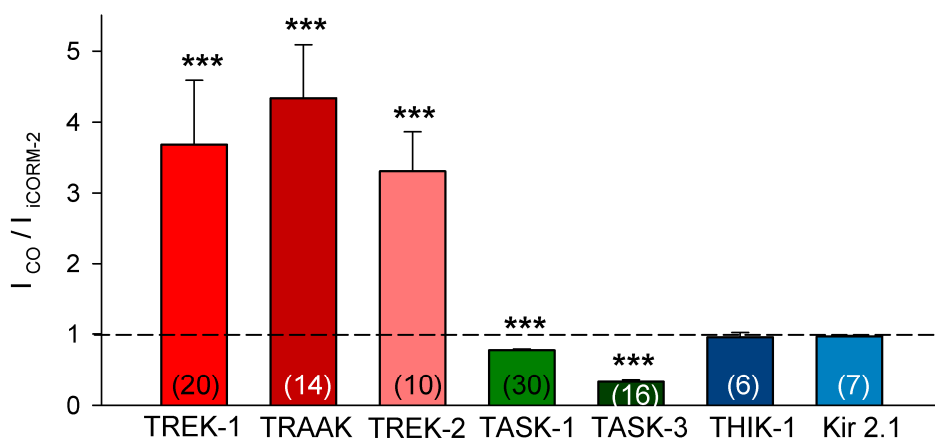


Abb. 3.19 Strommessungen weiterer Kaliumkanäle nach Zugabe von CORM-2

Relative Stromamplitude von TREK-1 (rot), TRAAK (dunkelrot), TREK-2 (hellrot), TASK-1 (grün), TASK-3 (dunkelgrün), THIK-1 (blau) und Kir2.1 (hellblau) nach Applikation von CORM-2 [$30 \mu M$] in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden zum Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert, jeweils 4,5 min nach Zugabe ausgewertet und auf Strommessungen mit inaktivem CORM-2 normalisiert (gestrichelte Linie). Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist in Klammern angegeben. Als Fehler wurde der Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

4. Diskussion

TREK-1 gehört zur Familie der mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle und wird durch physikalische und chemische Stimuli sowie einige bereits bekannte Interaktionspartner reguliert. Ziel dieser Arbeit war es, die funktionellen Auswirkungen der Interaktion zwischen TREK-1 und der Hämoxygenase-2 zu beschreiben und die Mechanismen der Wirkung von Kohlenstoffmonoxid (CO) auf den TREK-1 Strom aufzuklären.

4.1. Die Interaktion von TREK-1 mit HO-2

Das Enzym Hämoxygenase HO-2, welches konstitutiv in Zellen exprimiert wird, interagiert direkt mit dem TREK-1 Kanal im Hefe-Zwei-Hybrid System (Koschinsky 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die Interaktion auch in humanen Expressionssystemen auftritt. TREK-1-EGFP zeigte nach Immunopräzipitation und Immundetektion mit einem GFP-Antikörper eine gut erkennbare Doppelbande auf dem Western-Blot. Die nachgewiesene Doppelbande ist bei Verwendung des Fusionsproteins TREK-1-EGFP und der anschließenden Detektion mit GFP-Antikörper plausibel, da aufgrund der alternativen Translationsinitiation (ATI) am Aminoterminus von TREK-1 zwei unterschiedlich große TREK-1-EGFPs entstehen können (siehe 1.3.1). Da HO-2 endogen in HeLa Zellen exprimiert wird, konnte das Enzym mit TREK-1-EGFP koimmunopräzipitiert werden. Eine Interaktion von HO-2 mit EGFP konnte ausgeschlossen werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 auch in humanen Zellen stattfindet.

Gegenwärtig sind drei Isoformen des HO-Enzyms bekannt. Alle drei besitzen einen carboxyterminalen hydrophoben Membrananker, unterscheiden sie sich jedoch deutlich in ihrer Struktur, Regulation und Expression in verschiedenen Zellen und Geweben (siehe 1.4.2). Im Unterschied zu HO-2 konnte für die Isoform HO-1 keine Interaktion mit TREK-1 nachgewiesen werden (Kocher 2012). Ein Sequenzvergleich der Isoformen HO-2 und HO-1 zeigte eine 45%ige Identität und 78%ige Similarität in den Aminosäuresequenzen und teilweise strukturelle Unterschiede zwischen beiden Isoformen. Besonders offensichtlich

waren Unterschiede im Aminoterminus, im Bereich der hämregulatorischen Motive 2 und 3 und im Carboxyterminus (Abb. 3.2). Mit Hilfe von unterschiedlichen Deletionsmutanten von HO-2 konnte in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen (Y2H) gezeigt werden, dass weder der Aminoterminus noch die hämregulatorischen Motive 2 und 3 essentiell für eine Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 sind. Somit kann geschlussfolgert werden, dass besonders der distale carboxyterminale Bereich der HO-2, welcher starke Unterschiede zur HO-1 aufweist, wichtig für die Interaktion ist.

4.2 Funktionelle Auswirkungen von HO-2 auf den TREK-1 Strom

In den Arbeiten von Koschinsky (2010) und Kocher (2012) zur funktionellen Auswirkung der Interaktion zwischen TREK-1, HO-2 und HO-1 konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression der HO-2 zu einer Erhöhung der Stromamplitude von TREK-1 in *Xenopus* Oozyten führt, während eine Koexpression mit HO-1 keinen signifikanten Einfluss auf die TREK-1 Stromamplitude hat. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Oberflächenexpression von TREK-1 unter dem Einfluss von HO-2 nicht verändert wurde. Daher scheint die Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals zu spielen (Koschinsky 2010). Wie bereits unter 1.4.2 beschrieben, besteht die wichtigste Funktion der HO-2 im katalytischen Abbau von Häm. Dabei spielt die katalytische Region im Bereich von Aminosäure 149-169 bei der Ausbildung einer Häm-Bindungstasche eine wichtige Rolle. Eine besondere Bedeutung besitzt auch Histidin an Aminosäureposition 45, welches das Häm im katalytischen Zentrum stabilisiert (siehe 1.4.2, Abb 1.7) (Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2014). Der Austausch von Histidin 45 zu Asparagin bzw. Alanin (HO-2^{H45N}) führt zu einer katalytisch inaktiven Form des Enzyms (Ishikawa 1998; Kim & Doré 2005). Interessanterweise konnte auch nach Einführung der Mutation eine Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2^{H45N} im Y2H-System nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zur funktionellen Auswirkung zwischen TREK-1 und HO-2 zeigten, dass die Koexpression von TREK-1 mit HO-2^{H45N} zu keiner signifikanten Änderung in der Stromamplitude des Kanals führte, während die Koexpression von TREK-1 mit HO-2 den TREK-1 Strom um 20% erhöhte. Somit scheinen die katalytisch wichtigen

Strukturelemente der HO-2 nicht essentiell für die Interaktion mit TREK-1 zu sein, die enzymatische Aktivität der HO-2 führt hingegen zu einer Beeinflussung des TREK-1 Stromes.

4.3 Zugabe von Hämin als Substrat der HO-2

Die katalytische Aktivität der HO-2 kann durch Zugabe von Häm bzw. Hämin gesteigert werden (siehe 1.4.2). Häm-Moleküle sind Komplexverbindungen, die aus einem zweiwertigen Eisenion als Zentralatom und einem Protoporphyrin-IX-Ringsystem als Ligand bestehen (Hämin: Form des Häms mit Fe^{3+}). Obwohl Häm für eine Vielzahl von Prozessen im Organismus essentiell ist, wirkt sich ein Überschuss an intra- und extrazellulärem Häm toxisch aus. Um die zelluläre Homöostase zu erhalten, existieren deshalb eine Reihe von Regulationsmechanismen (siehe 1.4). So wird der Hämabbau mittels Hämoxygenasen genau kontrolliert (Chiabrando et al. 2014). *Xenopus* Oozyten können Hämin importieren (Duffy et al. 2010) und exprimieren HO-2 endogen (Abb. 3.6). Hämin wird durch Hämoxygenasen zu Fe^{3+} , Biliverdin und CO abgebaut (siehe 1.4; 1.4.2). Eine Applikation in die Badlösung führte vermutlich zur Aufnahme von Hämin in die Oozyten, zum HO-2 katalysierten Abbau und zu einem signifikanten Anstieg des TREK-1 Stromes um 58%. Da nach heterologer Expression von TREK-1 mit koinjizierter humaner HO-2 nun verstärkt HO-2 in den Oozyten exprimiert wurde, führte die Zugabe von Hämin zu einem verstärkten Abbau und zu einer signifikant höheren Aktivierung des Kanals auf das 2-fache. Nach Koexpression des Kanals mit der katalytisch inaktiven Form HO-2^{H45N} konnte Hämin nur noch durch die endogene HO-2 abgebaut werden und der Kanal zeigte eine geringere Aktivierung von 42%. Interessanterweise wurden die Stromamplituden der Kaliumkanäle Kir2.1 und TASK-3, welche nicht mit HO-2 interagieren (Koschinsky 2010; Kocher 2012), durch Zugabe von Hämin nicht verändert. Diese Resultate stützen die Arbeitshypothese, dass vermutlich die lokal entstehenden Abbauprodukte von Hämin einen aktivierenden Effekt auf den Kanal haben.

4.4 Hemmung der HO-2 durch Zinkprotoporphyrin

Metalloporphorine, wie z.B. Zinkprotoporphyrin (ZnPP), sind synthetische Häm-Derivate, welche die katalytische Aktivität der Hämoxygenase-Enzyme kompetitiv hemmen. Die Zugabe von ZnPP in die Badlösung nach heterologer Expression von TREK-1 in Oozyten führte zu einer signifikanten Reduktion der TREK-1 Stromamplitude um 11%. Die Koexpression von TREK-1 und humaner HO-2 zeigte zunächst eine signifikante Zunahme der TREK-1 Stromamplitude, welche durch Zugabe des HO-2 Inhibitors um 20% reduziert wurde. Eine Koexpression von TREK-1 mit der katalytisch inaktiven HO-2^{H45N} zeigte keine Änderung der TREK-1 Stromamplitude, die Zugabe von ZnPP bewirkte aber eine Inhibition um 13%.

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die katalytische Aktivität der endogenen HO-2 die Aktivität des heterolog exprimierten TREK-1 beeinflusst, dass eine erhöhte Expression der HO-2 den Kanal stärker aktiviert und dass eine Inhibition der katalytischen Aktivität des Enzyms diesen Effekt signifikant reduziert.

4.5 Wirkung von CO auf TREK-1 Kanäle

Da die enzymatische Aktivität der HO-2 eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der TREK-1 Kanalaktivität spielt, wurde auch der Einfluss des entstehenden Abbauproduktes CO auf TREK-1 untersucht. Da Arbeiten mit CO-Gas aufgrund hoher Toxizität gefährlich sind, wurden in den letzten Jahren CO-freisetzende Moleküle (CORMs) entwickelt, die CO unter bestimmten physiologischen Bedingungen transportieren und freisetzen können (Motterlini et al. 2002; Nobre et al. 2007; Guillén et al. 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass CORM-2 den TREK-1 Kanal aktivieren kann (Dallas, Scragg & Peers 2008; Koschinsky 2010). CORM-2 ist ein metallorganischer Carbonylkomplex, bei dem CO an das Übergangsmetallatom Ruthenium gebunden ist (siehe 2.3.5). Nach der CO-Freisetzung aus CORM-2 kann jedoch eine Akkumulation von toxischem Ruthenium auftreten und zu Zellschädigungen und unerwünschten Nebenwirkungen führen (Winburn et al. 2012). Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch

weitere CO-freisetzende Moleküle wie das PhotoCORM-S1, in welchem CO an Fe^{3+} gebunden ist, und CO-Gas einen Effekt auf den TREK-1 Kanal haben.

Alle verwendeten CO-Quellen führten zu einer Aktivierung des heterolog exprimierten TREK-1 Kanals in *Xenopus* Oozyten, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Während CORM-2 zu einer Aktivierung des TREK-1 Stromes auf das 3-fache führte, wurde der Kanal durch das PhotoCORM-S1 nur um 83% und durch CO-Gas nur um 25% aktiviert. Die Gründe für die unterschiedliche Stärke der Effekte durch die verschiedenen CO-Quellen könnten darin liegen, dass nicht genau bekannt ist, wieviel und wie schnell CO tatsächlich aus den CORMs freigesetzt wird. Weiterhin wird das PhotoCORM-S1 lichtabhängig aktiviert, es hängt also von der Dauer der Lichtexposition ab, wie hoch die erreichte CO-Konzentrationen ist. Auch bei Versuchen mit CO-begaster Lösung konnte nicht überprüft werden, wie hoch die tatsächliche CO-Konzentration zum Zeitpunkt der Applikation war. Da aber gezeigt werden konnte, dass alle verwendeten CO-Donatoren (CORM-2, CORM-S1 und CO-Gas) einen aktivierenden Effekt auf den TREK-1 Kanal ausüben und die inaktiven Kontrollen (iCORM-2 und iCORM-S1) keinen Effekt auf den TREK-1 Kanal haben, kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung des TREK-1 nicht durch unspezifische Nebeneffekte vermittelt wurde. Da CORM-2 die stärkste Aktivierung des TREK-1 bewirkte, wurden alle weiteren Messungen mit diesem CO-Donator durchgeführt.

Untersuchungen in unterschiedlichen Expressionssystemen zeigten eine CO-abhängige Aktivierung des TREK-1 sowohl in *Xenopus* Oozyten, als auch in HEK293 Zellen. Allerdings war die Stärke der CO-abhängigen Aktivierung und die Dauer, bis der maximale Effekt erreicht wurde, in beiden Expressionssystem unterschiedlich. Während in HEK293 Zellen eine maximale Aktivierung um 67% nach 2 min erreicht wurde, war die Aktivierung in Oozyten langsamer und erreichte erst nach 5 min einen maximalen Effekt. Ein Grund hierfür könnte der stark variierende Phosphorylierungsstatus des TREK-1 in den verschiedenen Expressionssystemen sein, welcher unter 4.6 ausführlich diskutiert wird.

4.6 Phosphorylierungsstatus des TREK-1 in HEK293 Zellen und *Xenopus* Oozyten

Im Carboxyterminus des TREK-1 Kanals existieren verschiedene Phosphorylierungsstellen, welche die Aktivität des Kanals stark regulieren können. Untersuchungen in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen zeigten, dass der TREK-1 Kanal durch PKA- und PKG-abhängige Phosphorylierung unterschiedlich reguliert wird (Tab. 4.1).

Zunächst wurde Serin 344 im TREK-1c untersucht, welches in der Literatur als PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle beschrieben wird und nach Phosphorylierung den Kanal inhibiert (Koh et al. 2001; Murbartian et al. 2005; Patel et al. 1998). Mit Hilfe des PKA-Inhibitors H89 konnte ich zeigen, dass es sich bei der Phosphorylierungsstelle tatsächlich um eine PKA-Stelle handelt. H89 bindet als kompetitiver Antagonist an die katalytische Untereinheit der PKA, blockiert so die ATP-Bindung an das Enzym und verhindert die cAMP-abhängige Phosphorylierung von PKA Substraten (Murray 2008). Applikation von H89 führte im TREK-1c WT zu einer Zunahme des Stromes, während die Mutanten S344A und S344D durch Zugabe von H89 inhibiert wurden (Abb. 3.13). Die Inhibition der Mutanten S344A und S344D nach Zugabe von H89 könnte auf weitere (noch nicht bekannte) PKA-abhängige Phosphorylierungsstellen im TREK-1c hinweisen, die durch Phosphorylierung zu einer schwachen Aktivierung im TREK-1 führen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die leichte Abnahme des TREK-1 Stromes einen unspezifischen Nebeneffekt des H89 darstellt (Murray 2008).

Meine Untersuchungen der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S344 weisen auf einen stark variierenden Phosphorylierungszustand des TREK-1 Kanals in beiden Expressionssystemen hin. Die Mutation von Serin zu Aspartat (S344D) imitiert einen phosphorylierten Kanal und führte in HEK293 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Stromamplitude, während eine Mutation zu Alanin (S344A) einen dephosphorylierten Kanal imitiert und zu einer leicht erhöhten Stromamplitude führte (Tab. 4.1). In *Xenopus* Oozyten zeigte die S344A Mutante eine signifikante 7-fache Erhöhung der Stromamplitude, während die Stromamplitude der S344D Mutante geringer als der Wildtyp war (Tab. 4.1). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der TREK-1 Kanal in HEK293 Zellen eher im dephosphorylierten Zustand vorliegt, während er in

Xenopus Oozyten stärker phosphoryliert ist. Grund für den unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus könnte die Nutzung des unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitors Theophyllin in *Xenopus* Oozyten sein. Theophyllin führt durch Inhibition der PDEs zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und ist wichtig, um Oozyten in ihrer bestehenden Reifungsphase zu arretieren. Obwohl Theophyllin nur während der Inkubationszeit verwendet wurde, könnte es den stark phosphorylierten Zustand des TREK-1 während der Messungen erklären.

Expressions- system	<i>Xenopus</i> Oozyten	HEK 293
TREK-1c Mutanten	Änderung der Stromamplitude	Änderung der Stromamplitude
TREK-1c WT	100%	100%
S362A	290% ↑	59% ↓
S362D	143% ↑	121% ↑
S344A	723% ↑	128% ↑
S344D	72% ↓	21% ↓

Tab. 4.1 Gegenüberstellung der relativen Änderungen der Stromamplituden der TREK-1c Phosphorylierungsmutanten S362A, S362D, S344A, S344D in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen

Die in den Abb. 3.11 und 3.14 gezeigten Stromwerte der TREK-1c Phosphorylierungsmutanten wurden auf den TREK-1c WT normiert. Dargestellt sind die Steigerungen (grün) und die Reduktionen (rot) der absoluten Stromamplituden der TREK-1c Phosphorylierungsmutanten in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen.

In verschiedenen Publikationen konnte Serin an Position 362 als PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle identifiziert werden, die durch Phosphorylierung zu einer Aktivitätssteigerung des Kanals führt (Koh et al. 2001). In HEK293 Zellen führte die Mutation zu S362D zu einer leichten Zunahme der Stromamplitude, während eine Mutation zu S362A zu einer reduzierten Stromamplitude führte (Tab. 4.1). In *Xenopus* Oozyten führten beide Mutationen S362A und S362D zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude verglichen mit dem TREK-1 Wildtyp (Tab. 4.1).

Eine Begründung für die Erhöhung der Stromamplitude der S362A Mutante in *Xenopus* Oozyten könnte ein *cross-talk* („Überschneidung“) zwischen cGMP und cAMP vermittelten Signalwegen sein, welche durch Phosphodiesterasen (PDEs) reguliert werden können (Lugnier 2006). Eine weitere Möglichkeit ist,

dass die Phosphorylierungstellen im Carboxyterminus des TREK-1 voneinander abhängig sein könnten (Murbartian et al. 2005). Somit könnte eine Dephosphorylierung des Kanals an S362 zu einer stärkeren Dephosphorylierung an S344 führen und damit zu einer Zunahme des TREK-1 Stromes und umgekehrt.

4.7 Suche nach dem CO-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von TREK-1

Endogenes CO reguliert eine Reihe physiologischer Prozesse und ist ein wichtiges zelluläres Signalmolekül. Es ist in der Lage, mit Übergangsmetallen wie z.B. Nickel, Kupfer, Cobalt und häufig auch Eisen, zu reagieren. CO kann auf diese Weise mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren, verschiedene Signalwege modulieren und ist ein wichtiger Regulator von Ionenkanälen (siehe 1.4.3, Abb. 4.1).

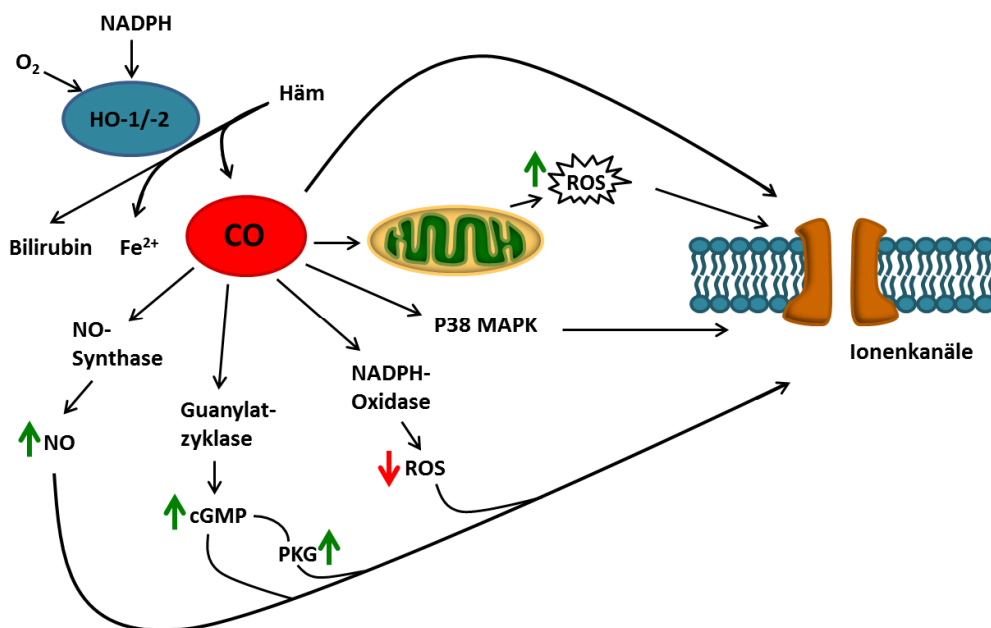


Abb. 4.1 Schematische Darstellung diverser CO-regulierter Signalwege und deren Einfluss auf Ionenkanäle

CO beeinflusst durch Regulation von Signalwegen eine Vielzahl von Ionenkanälen. Durch Aktivierung der NO-Synthase kommt es zu einer Erhöhung von Stickstoffmonoxid (NO), eine Aktivierung der Guanylatzyklase erhöht das cGMP-Level und führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase G und eine Aktivierung der NADPH-Oxidase reduziert die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Gleichzeitig erhöht CO, durch Modulation von Mitochondrien, die Entstehung von ROS. Weiterhin kann CO die P38 MAP-Kinase regulieren und einen direkten Effekt auf Ionenkanäle ausüben. [nach (Peers 2011)].

Es ist bekannt, dass CO durch Bindung an die prosthetische Hämgruppe der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zu deren Aktivierung führen kann. Dies führt zur Produktion von zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP), das als intrazelluläres Signaltransduktionsmolekül die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) vermittelt (Brüne & Ullrich 1987).

Die mögliche Wirkung von CO auf die PKG. Kürzlich wurde beschrieben, dass TREK-1 PKG-abhängig durch CO reguliert wird (Dallas, Scragg & Peers 2008). Aus der Beobachtung, dass bei beiden TREK-1 Mutanten S362A und S362D der CO-Donator CORM-2 zu einer Zunahme des Stromes führte, können wir schließen, dass die PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle S362 nicht an der Vermittlung des CO-Effektes beteiligt ist.

Expressions- system TREK-1c Mutanten	<i>Xenopus</i> Oozyten CORM-2 Effekt	HEK 293 CORM-2 Effekt
TREK-1c WT	400 % ↑	67% ↑
S362A	429% ↑	87 % ↑
S362D	567% ↑	209% ↑
S344A	56% ↑	73% ↑
S344D	65% ↑	230% ↑

Tab. 4.2 Gegenüberstellung des CORM-2 Effektes auf TREK-1c und die TREK-1c Phosphorylierungsmutanten S362A, S362D, S344A, S344D in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen

Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der unter Abb. 3.11 und 3.14 vorgestellten Ergebnisse. Gegenübergestellt wurden die Steigerungen der Stromamplituden des TREK-1c WT und der TREK-1c Phosphorylierungsmutanten (grün) nach Applikation des CO-Donators CORM-2 in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen.

Die mögliche Wirkung von CO auf die PKA. In Untersuchungen zur Freisetzung von Neurotransmittern konnte gezeigt werden, dass CO-Effekte durch einen Anstieg im cAMP-Spiegel entstehen können (Sitdikova et al. 2007). Im TREK-1c befindet sich eine in dieser Arbeit nachgewiesene PKA-Stelle an Position S344, welche die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals reguliert (siehe 4.6). In HEK293 Zellen bewirkte eine Applikation von CORM-2 eine signifikante Zunahme des TREK-1c^{S344A} Stromes vergleichbar mit dem WT und des TREK-1c^{S344D} Stromes erhöht gegenüber dem WT (Tab. 4.2), während in Oozyten die Zugabe zwar zu einer signifikanten Aktivierung in den Mutanten

führte, der Effekt in beiden Mutanten aber geringer war, verglichen mit dem WT (Tab. 4.2). Grund hierfür könnte der bereits beschriebene Phosphorylierungszustand und die damit verbundene unterschiedliche Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals in beiden Expressionssystemen sein (siehe 4.6). Eine Erklärung für die unterschiedliche Aktivierbarkeit der S344D Mutante durch CO in den verschiedenen Expressionssystemen kann an dieser Stelle nicht gegeben werden.

Weitere mögliche Wirkungen von CO. CO kann mit weiteren hämhaltigen Proteinen interagieren. So bindet es an die NADPH-Oxidase und in den Mitochondrien an die Cytochrom-c-Oxidase im Komplex 4, unterbricht die Atmungskette und trägt so zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei (Zuckerbraun et al. 2007). So wird beispielsweise der L-Typ Calcium-Kanal PKG- und NO-unabhängig durch CO inhibiert. Diese Wirkung von CO wird ROS-abhängig durch Oxidation der Cysteinreste im Carboxyterminus des Kanals vermittelt (Scragg et al. 2008). Mutationen der Cysteinreste im Carboxyterminus des TREK-1 Kanals führten im Unterschied zum L-Typ Calcium-Kanal zu keiner Veränderung der CO-abhängigen Aktivierung des Kanals. Ein ROS-abhängiger Signalweg kann somit für die Cysteinreste im Carboxyterminus des TREK-1 Kanals ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Kanal, der durch CO aktiviert werden kann, ist der BK_{Ca}-Kanal. In diesem Falle wird die Wirkung von CO durch Calcium vermittelt, wobei ein Cystein an Aminosäureposition 911 entscheidend für die Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals ist (Telezhkin et al. 2011). Aus diesem Grund wurden weitere Cysteine in der helikalen Cap Helix (C104) und in den Transmembransegmenten 2 (C170) und 3 (C230) des TREK-1c Kanals untersucht. Zugabe von CORM-2 führte in allen Mutanten zu einer signifikanten Aktivierung der Ströme, vergleichbar mit dem TREK-1 Wildtyp. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass auch diese Cysteine nicht in die Vermittlung des CO-Effektes involviert sind.

Wirkung von CO nach Deletion des Amino- und Carboxyterminus im TREK-1. Um auszuschließen, dass S344 oder weitere Phosphorylierungsstellen im Carboxyterminus (CT) und der Aminoterminal (NT) des Kanals in *Xenopus* Oozyten an der CO-abhängigen Aktivierung des Kanals beteiligt sind, wurden die beiden carboxy- und aminoterminalen Trunkierungsmutanten TREK-1^{ΔCT} und TREK-1^{ΔNT} untersucht. Wie in der

Literatur beschrieben produzierten beide Mutanten einen deutlich geringeren Strom als der WT Kanal (Kennard et al. 2005; Veale et al. 2014). Applikation von CORM-2 zeigte aber eine signifikante Erhöhung der TREK-1^{ΔCT}- und TREK-1^{ΔNT}- Ströme, die ähnlich zum WT Kanal waren. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die zytosolischen N- und C-Termini nicht an der CO-abhängigen Aktivierung des TREK-1 beteiligt sind. Dadurch kann auch ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierungsstelle S344 die CO-abhängige Aktivierung vermittelt.

4.8 Die Wirkung von NO auf den TREK-1 Kanal

Als Kontrolle der angewandten Methodik wurden elektrophysiologische Messungen mit dem gasförmigen intrazellulären Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) in *Xenopus* Oozyten durchgeführt. NO bindet wie CO an die prosthetische Hämgruppe der β -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und führt zur Aktivierung des Enzyms. Dies führt zur Bildung von cGMP und zur Aktivierung der PKG (Francis, Busch & Corbin 2010). Koh und Mitarbeiter konnten zeigen, dass NO zu einer PKG-abhängigen Aktivierung des TREK-1 Kanals führt, die durch S362 vermittelt wird (Koh et al. 2001). Meine Messungen mit NO zeigten eine Aktivierung des TREK-1c Stromes um 72%, während bei der Mutante TREK-1c^{S362D} keine signifikante Erhöhung der Stromamplitude nach Applikation von NO auftrat. Daraus lässt sich ableiten, dass NO tatsächlich über eine Aktivierung der PKG vermittelt wird. Obwohl CO und NO an die sGC binden können (Verma et al. 1993) und damit zur Aktivierung der PKG führen, wird der Effekt der beiden gasförmigen Signalmoleküle auf den TREK-1 unterschiedlich vermittelt.

Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Stärke der Bindung und die damit verbundene Aktivierung der sGC durch NO bzw. CO sein. Während NO zu einer 130-fachen Aktivierung der sGC führt, entsteht durch eine Bindung von CO nur eine 4,4-fache Aktivierung des Enzyms (Stone & Marletta 1994). Es wird vermutet, dass der durch CO vermittelte Effekt ein weiteres Signalmolekül benötigt oder, dass weitere Signalwege involviert sind (Boehning & Snyder 2003).

Erstaunlicherweise war die S344D Mutante durch NO stärker aktivierbar (2,8-fach) als der WT Kanal (72%). Eine Begründung für dieses Ergebnis

könnte der bereits beschriebene *cross-talk* zwischen den cGMP und cAMP vermittelten Signalwegen sein und die Abhängigkeit der Phosphorylierungsstellen voneinander.

Im Unterschied zu den CO-Messungen zeigten Messungen mit NO, dass die Δ CT Mutante von TREK-1 nach Zugabe des Gasotransmitters nicht aktiviert wurde. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Aktivierung des TREK-1 durch die Gasotransmitter CO und NO durch unterschiedliche Signalwege vermittelt wird.

4.9 Direkte Wirkung von CO auf den TREK-1 Kanal

Um den CO-abhängigen Signalweg in Abwesenheit von Kinaseaktivitäten und sekundären zytosolischen Botenstoffen zu untersuchen, wurden Giant-Patch Messungen durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, inside-out Messungen durchführen zu können, ohne auf Einzelkanalebene zu arbeiten (siehe 2.3.3). Inside-out Messungen mittels der Giant-Patch Methode in Oozyten zeigten einen typischen Anstieg der Stromamplitude über die Zeit. Eine Begründung für diese Zeitabhängigkeit könnte eine langsame Dephosphorylierung des Kanals sein. In *Xenopus* Oozyten wird das in der Membran verankerte Gravin (AKAP250) exprimiert (Klingbeil, Frazzetto & Bouwmeester 2001), das neben PKA und PKC auch an Serin/Threonin-Phosphatase PP2B bindet. Gravin wird Calcium-abhängig aktiviert (Shih et al. 1999), besitzt jedoch auch eine basale Grundaktivität und könnte durch Dephosphorylierung zu einer Aktivierung des Kanals führen (Ingebritsen & Cohen 1983). Da in den Messlösungen kein ATP enthalten ist, kann eine PKA-abhängige Phosphorylierung des Kanals und eine damit verbundene Inhibition nicht stattfinden. Ein Ungleichgewicht zwischen De- und Phosphorylierung würde die langsame, aber stetige Aktivierung des TREK-1 über die Zeit erklären. Der *run-up* wurde mittels Extrapolation dargestellt, um eine Aktivierung des Kanals von der stetigen Aktivierung zu unterscheiden. Die Applikation von CORM-2 führte, verglichen mit der Zugabe von inaktivem CORM-2, zu einer signifikanten Aktivierung des TREK-1 Stromes um 46%. Das Ergebnis zeigt, dass der TREK-1 Kanal direkt und in Abwesenheit eines intrazellulären Proteinkinase-abhängigen Signalweges aktiviert werden kann.

4.10 Einfluss von CO auf die Aktivität weiterer Kaliumkanäle

In den letzten Jahren konnte eine Reihe CO-sensitiver Kanäle identifiziert werden (siehe 1.4.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob weitere K_{2P} -Kanäle durch CO reguliert werden können.

Zunächst wurden die Kanäle TREK-2 und TRAAK untersucht, welche ebenfalls zur Subfamilie der mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle gehören (siehe 1.2 und 1.3). Eine große Ähnlichkeit besteht zwischen den Aminosäuresequenzen von TREK-1 und TREK-2, welche zu 63% identisch und zu 78% homolog sind, während TREK-1 und TRAAK zu 45% identisch sind und eine Homologie von 69% aufweisen (Noël, Sandoz & Lesage 2011).

Interessanterweise führte die Zugabe von CORM-2 in TREK-2 und TRAAK zu einer signifikanten 3-4 fachen Aktivierung des Stromes, ähnlich zum TREK-1.

Obwohl die Kanäle zur mechanosensitiven Subfamilie gehören und viele Gemeinsamkeiten besitzen, ist die Regulation durch Phosphorylierungen in den Carboxytermini der Kanäle stark unterschiedlich. Während TREK-2 ebenfalls durch PKA- und PKC- abhängige Phosphorylierung reguliert wird (Lesage et al. 2000), ist TRAAK insensitiv gegenüber einer Phosphorylierung durch die Kinasen (Fink et al. 1998). Zudem ist in TREK-2 und TRAAK keine PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle zu finden, die analog zu S362 im TREK-1c ist. Dies hat zur Folge, dass TREK-2 und TRAAK im Unterschied zu TREK-1 nicht durch NO reguliert werden können (Enyedi & Czirjak 2010). Diese Daten sind im Einklang mit der Hypothese, dass die CO-abhängige Aktivierung der mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle TREK-1, TREK-2 und TRAAK weder PKA- noch PKG-abhängig vermittelt werden.

Weiterhin habe ich untersucht, ob TASK-1 und TASK-3, beide Mitglieder der säuresensitiven Subgruppe der K_{2P} -Kanalfamilie (siehe 1.2), durch den CO-Donator CORM-2 reguliert werden. Beide Kanäle werden stark im Glomus caroticum der Maus exprimiert, durch Hypoxie inhibiert und fungieren möglicherweise als Sauerstoffsensoren; der genaue Regulationsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. (Buckler 2007; Buckler et al. 2006; Turner & Buckler 2013). Erstaunlicherweise wurden beide Kanäle durch Zugabe von CORM-2 inhibiert. Es ist bekannt, dass das Komplexsalz Rutheniumrot TASK-3 besonders stark inhibieren kann, während TASK-1 eher schwach inhibiert wird (Czirják & Enyedi 2002; Czirják & Enyedi 2003). Auch in CORM-2 ist Ruthenium

enthalten. Da jedoch nach Kontrollmessungen mit inaktivem CORM-2, welches weiterhin Ruthenium enthielt, keine signifikanten Veränderungen im TASK-1 und TASK-3 Strom auftraten, kann ausgeschlossen werden, dass der inhibitorische CO-Effekt durch Ruthenium vermittelt wird. Wie CO die TASK-1 und TASK-3 Kanäle regulieren kann ist noch unklar.

Ein weiterer sauerstoffsensitiver K_{2P} -Kanal ist der THIK-1 (Campanucci et al. 2005) (siehe 1.2), welcher nach Applikation von CO keine signifikante Veränderung in der Stromamplitude zeigte.

Außerdem wurde der einwärts gleichrichtende Kaliumkanal Kir2.1 untersucht, der nicht zur K_{2P} -Kanalfamilie gehört (siehe 1.1). CORM-2 übte keinen Effekt auf die Stromamplitude des Kir2.1 aus. Kürzlich wurde publiziert, dass CORM-2 die Kanäle Kir2.2 und Kir2.3 in inside-out Messungen direkt inhibiert, während Kir2.1 nicht durch CO beeinflusst wird (Liang et al. 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse stimmen mit diesen kürzlich publizierten Daten gut überein. Ein genauer Regulationsmechanismus konnte auch bei Kir2.2 und Kir2.3 noch nicht aufgeklärt werden, allerdings konnte gezeigt werden, dass die CO-abhängige Inhibierung der Kir-Kanäle PIP_2 -abhängig reguliert wird.

4.11 Wie könnte eine direkte Wirkung von CO auf TREK-1 vermittelt werden?

Untersuchungen an artifiziellen Membranen ergaben, dass TREK-1 sowohl durch positive als auch durch negative Druckänderungen an der Zellmembran aktiviert wird, und dass die Mechanosensitivität direkt über die Lipidmembran vermittelt wird (Brohawn, Su & MacKinnon 2014) (siehe 1.3.1). Auch Fluoxetin, Chlorpromazin, Lachgas, Cyclopropan und Xenon können den TREK-1 nach Deletion des CT ab AS 334 unabhängig von einem phosphorylierungs-abhängigen Signalweg aktivieren (Gruss et al. 2004; Kennard et al. 2005; Patel et al. 1998). Anhand von Membranmodellen konnte gezeigt werden, dass das Edelgas Xenon, welches ein ausgezeichnetes Anästhetikum darstellt, und weitere volatile Anästhetika die Verteilung von *Lipid Rafts* in der Membran verändern (Weinrich & Worcester 2013). Diese Veränderungen in der Membran könnten zu erheblichen mechanischen Effekten führen, die wiederum einen Einfluss auf mechanosensitive Kanäle haben. Dieser Mechanismus, in der

Literatur als *Mechanopharmakologie* beschrieben, konnte schon für verschiedene mechanosensitive Ionenkanäle gezeigt werden (Lee & MacKinnon 2004; Schmidt & MacKinnon 2008; Suchyna et al. 2004). CO und Xenon sind beide gasförmige Signalmoleküle, die neben TREK-1 auch den mechanosensitiven K_{2P} -Kanal TREK-2 in ähnlicher Stärke aktivieren. Darüber hinaus kann CO den ebenfalls mechanosensitiven K_{2P} -Kanal TRAAK aktivieren.

Auch Kir2.2 und 2.3 können, im Unterschied zu Kir2.1, direkt durch CO reguliert werden. Dabei spielt die Affinität für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) eine entscheidende Rolle (Liang et al. 2014). Der sekundäre Botenstoff PIP_2 ist am inneren Faltblatt der Plasmamembran lokalisiert und stabilisiert bzw. reguliert die Aktivität zahlreicher Proteine wie z.B. Ionenkanäle.

Kir2.1 besitzt eine starke Affinität für PIP_2 und ist CO-insensitiv, während Kir2.3 und Kir2.2 eine geringere Affinität für PIP_2 besitzen und durch CO inhibiert werden. Erstaunlicherweise kann durch Mutationen der PIP_2 -Bindestellen in Kir2.1 und Kir2.3 die CO-Sensitivität der Kir-Kanäle verändert werden. Auch die Zugabe eines synthetischen PIP_2 -Analogons verringert die CO-Sensitivität (Liang et al. 2014). Es wird vermutet, dass CO die PIP_2 -Bindung an den Kanal beeinflusst, wobei ein genauer Regulationsmechanismus noch unklar ist.

Interessanterweise wird auch der TREK-1 Kanal PIP_2 -abhängig reguliert (siehe 1.3.1). In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, ob PIP_2 ebenfalls die CO-Sensitivität des TREK-1 beeinflussen kann. Weitergehend müsste aufgeklärt werden, ob CO ebenso wie Xenon zu Veränderungen an der Membran führen kann. Dies könnte eine direkte Wirkung von CO auf die mechanosensitiven, PIP_2 -abhängigen Kanäle wie TREK-1, TREK-2 und TRAAK (Lopes et al. 2005; Zheng et al. 2009) erklären.

4.12 Die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2

TREK-1 und HO-2 werden verstärkt in Neuronen exprimiert und besitzen eine neuroprotektive Rolle, während die Isoform HO-1 nur sehr schwach in Gliazellen bei oxidativem Stress exprimiert wird. HO-2 schützt kortikale, hippocampale und cerebellare Körnerzellen gegen apoptotischen Zelltod bei ischämischen Verletzungen *in vivo* (Doré et al. 1999). In HO-2 knockout

Mäusen treten verstärkt neuronale Hirnschädigungen und Hirnschwellungen nach Ischämie auf. Im Gegensatz dazu zeigen HO-1 knockout Mäuse keine neuronalen Schädigungen nach ischämischen Zuständen (Doré et al. 1999). Interessanterweise tritt auch in TREK-1^{-/-} Mäusen eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber Ischämie auf (Heurteaux et al. 2004). Durch eine Interaktion zwischen TREK-1 mit HO-2 könnten lokal höhere CO-Konzentrationen entstehen, die zu einer Aktivierung des Kanals führen, das Ruhemembranpotential stabilisieren und während einer Ischämie eine Übererregung der Neurone verhindern.

Durch den Aufbau aus verschiedenen funktionellen Regionen wird die HO-2 als universeller Sauerstoffsensor diskutiert. Zum einen regulieren drei hämregulatorische Motive (HRM) die Aktivität des Enzyms sauerstoffabhängig (Abb.1.7) (Yi et al. 2009). Zum anderen befindet sich eine sauerstoffsensitive Konsensussequenz in der HO-2 mRNA, welche zu 100% identisch mit der sauerstoffsensitiven Konsensussequenz des Erythropoietin-Gens ist und auf Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration reagiert (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas 2014). Auch eine Interaktion mit dem BK_{Ca} Kanal in den Karotiden und die sauerstoffabhängige Regulation des Kanals durch HO-2 legen die Vermutung nahe, dass der HO-2 eine Funktion als Sauerstoffsensor zukommt (Williams 2004). In HO-2^{-/-} Mäusen führt der Verlust der HO-2 zu Hypoxämie, einer Vergrößerung der Karotiden und zur Rechtsherzhypertrophie (Shibahara et al. 2007). Auch TREK-1 wird in den Karotiden der Ratte exprimiert (Yamamoto 2006). Weiterhin konnte ein TREK-ähnlicher Kanal in den Karotiden von TASK-1/3^{-/-} Mäusen identifiziert werden (Turner & Buckler 2013). Darüber hinaus kann TREK-1 sauerstoffabhängig reguliert und durch Hypoxie inhibiert werden (Kreneisz et al. 2009; Miller et al. 2003). Eine Interaktion zwischen HO-2 und TREK-1 könnte in den Karotiden und weiteren sauerstoffsensitiven Geweben eine wichtige physiologische Relevanz besitzen. Unter hypoxischen Bedingungen sinkt die Aktivität der HO-2, dadurch wird weniger Häm abgebaut und weniger CO gebildet. Eine verminderte CO-Produktion verhindert eine Aktivierung des TREK-1, könnte so zu einer Inhibition des Kanals bei Hypoxie führen und zur schnelleren Depolarisation der Zellen beitragen. HO-2 könnte somit auch als Sauerstoffsensor für TREK-1 in verschiedenen Geweben eine Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Schlüsselwörter: K₂P-Kanäle, TREK-1, Hämoxygenase-2 (HO-2), Protein-Protein Interaktion, Kohlenstoffmonoxid (CO), CO-freisetzende Moleküle (CORMs), Stickstoffmonoxid (NO)

Der mechanosensitive K₂P-Kanal TREK-1 wird durch eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Stimuli, sowie durch eine Reihe von Interaktionspartnern reguliert. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Interaktion des TREK-1 Kanals mit dem Enzym Hämoxygenase 2 (HO-2), welches den stereospezifischen Abbau von Häm zu Biliverdin, Fe²⁺ und CO katalysiert, zu charakterisieren und die funktionellen Auswirkungen aufzuklären.

Die Interaktion zwischen dem Enzym HO-2 und TREK-1 konnte durch Koimmunopräzipitation bestätigt werden. Untersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid System mit HO-2 Verkürzungsmutanten zeigten, dass der distale Carboxyterminus der HO-2 eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem TREK-1 Kanal spielt. Die funktionellen Auswirkungen der Interaktion wurden mittels Strommessungen in *Xenopus* Oozyten untersucht. Eine Koexpression von humaner HO-2 und TREK-1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude von TREK-1, während die Koexpression der katalytisch inaktiven Form des Enzyms HO-2^{H45N}, die ebenfalls mit TREK-1 interagiert, keine signifikante Änderung der Stromamplitude im Kanal hervorrief.

Die funktionelle Relevanz der katalytischen Aktivität der HO-2 wurde mit Hilfe von Aktivatoren und Inhibitoren untersucht. Zugabe von Hämin, einem Aktivator der HO-2, führte in Oozyten, die HO-2 konstitutiv exprimieren, zu einem signifikanten Anstieg des TREK-1 Stromes. Zusätzliche Koexpression der humanen HO-2 führte zu einer signifikant stärkeren Zunahme des TREK-1 Stromes. Applikation von Zinkprotoporphyrin (ZnPP), einem HO-2 Inhibitor, führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der TREK-1 Stromamplitude.

Applikation von CO mit Hilfe des CO-freisetzenden Moleküls CORM-2 führte zu einer Aktivierung des TREK-1 Kanals in *Xenopus* Oozyten und HEK293 Zellen.

Messungen mit PhotoCORM-S1 und CO-Gas zeigten ebenfalls eine signifikante Aktivierung des TREK-1 Kanals. Auch die mechanosensitiven K_{2P} -Kanäle TREK-2 und TRAAK konnten in ähnlichem Ausmaß wie TREK-1 durch CO aktiviert werden.

CO ist ein wichtiges zelluläres Signalmolekül, interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen und kann eine Reihe von Signalwegen modulieren. Meine Untersuchungen zu möglichen CO-abhängigen Signalwegen zeigten, dass die verschiedenen Phosphorylierungsstellen S362 (PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle) und S344 (PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle) im Carboxyterminus des TREK-1 Kanals nicht an der CO-vermittelten Aktivierung beteiligt sind. Eine Deletion des zytosolisch lokalisierten TREK-1 Aminoterminus bzw. Carboxyterminus zeigte darüber hinaus, dass die verkürzten Kanalvarianten weiterhin durch CO aktiviert werden konnten. Die Aktivierung des TREK-1 Stromes durch das gasförmige Signalmolekül NO war bei der carboxyterminalen Verkürzungsvariante allerdings nicht mehr möglich. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die gasförmigen Signalmoleküle CO und NO die Öffnungswahrscheinlichkeit von TREK-1 durch unterschiedliche Mechanismen beeinflussen. Eine direkte Wirkung von CO auf TREK-1 konnte durch inside-out Messungen in Giant-Patches von *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden.

Meine Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass HO-2 an TREK-1 Kanäle bindet und durch lokale Produktion von CO die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals reguliert.

6. Summary

Keywords: K_{2P}-channel, TREK-1, heme oxygenase 2 (HO-2), protein-protein interaction, carbon monoxide (CO), CO-releasing molecules (CORMs), nitric oxide (NO)

The mechanosensitive K_{2P}-channel TREK-1 is regulated by various physical and chemical stimuli, as well as interaction partners. The aim of this study was to characterize the interaction between TREK-1 and the enzyme HO-2, which catalyzes the breakdown of heme into biliverdin, Fe²⁺ and CO, and to clarify the functional consequences. Furthermore, the influence of CO on the TREK-1 channel was examined.

The interaction between TREK-1 and HO-2 was confirmed by coimmunoprecipitation in HeLa cell lysates. In addition, yeast-two-hybrid experiments with HO-2 deletion mutants showed that the distal carboxyterminus of HO-2 is crucial for the interaction with the TREK-1 channel. The functional consequences of this interaction were examined by using two-electrode-voltage-clamp (TEVC) measurements in *Xenopus* oocytes. Coexpression of human HO-2 and TREK-1 led to a significant increase of TREK-1 current amplitude, whereas coexpression of the catalytically inactive enzyme HO-2^{H45N}, which still interacts with TREK-1, evoked no significant change in the TREK-1 current amplitude.

The catalytic activity of HO-2 in *Xenopus* oocytes was modulated by application of HO-2 activators and inhibitors. *Xenopus* oocytes constitutively express HO-2. Application of Hemin, a HO-2 activator, led to a significant increase in TREK-1 currents. Additional coexpression of human HO-2 led to a significantly higher activation of TREK-1 currents. Application of zinc protoporphyrin, an HO-2 inhibitor, led to significant reduction of TREK-1 currents, which was higher after additional coexpression of human HO-2.

Application of carbon monoxide (CO) via CO-releasing molecule CORM-2 produced a significant increase of TREK-1 currents in *Xenopus* oocytes and in HEK293 cells. Further studies with the PhotoCORM-S1 and CO gas also

increased TREK-1 currents significantly. Furthermore, the related mechanosensitive K_{2P} -channels TREK-2 and TRAAK could also be activated by CO by a comparable degree as TREK-1.

CO is an important cellular signaling molecule which interacts with various proteins and modulates a number of signaling pathways. Investigations of a possible CO-dependent signaling pathway showed that the different phosphorylation sites S362 (PKG-phosphorylation site) and S344 (PKA-phosphorylation site) in the carboxyterminus of the channel were not involved in CO-mediated activation of the channel. Furthermore, deletion of the TREK-1 amino- or carboxyterminus showed that the shortened channels could still be activated by CO. Activation of TREK-1 currents by the gaseous signaling molecule NO was abolished in measurements with the carboxyterminal deletion mutant. Thus, the gaseous signaling molecules CO and NO appear to influence the open probability of TREK-1 via different signaling pathways. A direct CO-effect on TREK-1 channels was proven by using inside-out measurements (giant-patches) in *Xenopus* oocytes.

My results support the hypothesis that HO-2 binds to TREK-1 channels and regulates the open probability of the channel via local production of CO.

7. Literaturverzeichnis

- Aimond, F., J. M. Rauzier, C. Bony & G. Vassort. 2000. "Simultaneous Activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP Stimulates the K⁺ Current TREK in Cardiomyocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (50): 39110–16. doi:10.1074/jbc.M008192200.
- Allen, T. A. & W. S. Root. 1957. "Partition of Carbon Monoxide and Oxygen between Air and Whole Blood of Rats, Dogs and Men as Affected by Plasma pH." *Journal of Applied Physiology* 10 (2): 186–90.
- Alloui, A., K. Zimmermann, J. Mamet, F. Duprat, J. Noël, J. Chemin, N. Guy. 2006. "TREK-1, a K⁺ Channel Involved in Polymodal Pain Perception." *The EMBO Journal* 25 (11): 2368–76. doi:10.1038/sj.emboj.7601116.
- Althaus, M., M. Fronius, Y. Buchäcker, I. Vadász, W.C. Clauss, W. Seeger, R. Motterlini & R. E. Morty. 2009. "Carbon Monoxide Rapidly Impairs Alveolar Fluid Clearance by Inhibiting Epithelial Sodium Channels." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 41 (6): 639–50. doi:10.1165/rcmb.2008-0458OC.
- Ashmole, I., P. A. Goodwin & P. R. Stanfield. 2001. "TASK-5, a Novel Member of the Tandem Pore K⁺ Channel Family." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 442 (6): 828–33.
- Azzalin, A., Valentina F., Agustina A., Silvia C., Debora A., M. B. Pisu, R. Nano, G. Bernocchi, L. Ferretti & S. Comincini. 2006. "Interaction between the Cellular Prion (PrPC) and the 2P Domain K⁺ Channel TREK-1 Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (1): 108–15. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.097.
- Baker, S. A., G. W. Hennig, J. Han, F. C. Britton, T. K. Smith & S. D. Koh. 2008. "Methionine and Its Derivatives Increase Bladder Excitability by Inhibiting Stretch-Dependent K(+) Channels." *British Journal of Pharmacology* 153 (6): 1259–71. doi:10.1038/sj.bjp.0707690.
- Bang, H., Y. Kim & D. Kim. 2000. "TREK-2, a New Member of the Mechanosensitive Tandem-Pore K⁺ Channel Family." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (23): 17412–19. doi:10.1074/jbc.M000445200.
- Baum, M., E. Schiff, D. Kreiser, P. A. Dennery, D. K. Stevenson, T. Rosenthal & D. S. Seidman. 2000. "End-Tidal Carbon Monoxide Measurements in Women with Pregnancy-Induced Hypertension and Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183 (4): 900–903. doi:10.1067/mob.2000.109047.
- Bellner, L., L. Martinelli, A. Halilovic, K. Patil, N. Puri, M. W. Dunn, R. F. Regan & M. L. Schwartzman. 2009. "Heme Oxygenase-2 Deletion Causes Endothelial Cell Activation Marked by Oxidative Stress, Inflammation, and Angiogenesis." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331 (3): 925–32. doi:10.1124/jpet.109.158352.
- Béthune, J., F. Wieland & J. Moelleken. 2006. "COPI-Mediated Transport." *Journal of Membrane Biology* 211 (2): 65–79. doi:10.1007/s00232-006-0859-7.
- Bittner, S., T. Ruck, M. K. Schuhmann, A. M. Herrmann, H. Moha ou Maati, N. Bobak & K. Göbel. 2013. "Endothelial TWIK-Related Potassium Channel-1 (TREK1) Regulates Immune-Cell Trafficking into the CNS." *Nature Medicine* 19 (9): 1161–65. doi:10.1038/nm.3303.

- Boczkowski, J., J. J. Poderoso & R. Motterlini. 2006. "CO-Metal Interaction: Vital Signaling from a Lethal Gas." *Trends in Biochemical Sciences* 31 (11): 614–21. doi:10.1016/j.tibs.2006.09.001.
- Boehning, D., C. Moon, S. Sharma, K. J. Hurt, L. D. Hester, G. V. Ronnett, D. Shugar & S. H. Snyder. 2003. "Carbon Monoxide Neurotransmission Activated by CK2 Phosphorylation of Heme Oxygenase-2." *Neuron* 40 (1): 129–37.
- Boehning, D. & S. H. Snyder. 2003. "Annual Review of Neuroscience 26 (1): 105–31. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131047.
- Boehning, D., L. Sedaghat, T. W. Sedlak & S. H. Snyder. 2004. "Heme Oxygenase-2 Is Activated by Calcium-Calmodulin." *Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 30927–30. doi:10.1074/jbc.C400222200.
- Brohawn, S. G., J. del Marmol & R. MacKinnon. 2012. "Crystal Structure of the Human K2P TRAAK, a Lipid- and Mechano-Sensitive K⁺ Ion Channel." *Science* 335 (6067): 436–41. doi:10.1126/science.1213808.
- Brüne, B. & V. Ullrich. 1987. "Inhibition of Platelet Aggregation by Carbon Monoxide Is Mediated by Activation of Guanylate Cyclase." *Molecular Pharmacology* 32 (4): 497–504.
- Buckler, K. J. 2007. "TASK-like Potassium Channels and Oxygen Sensing in the Carotid Body." *Respiratory Physiology & Neurobiology* 157 (1): 55–64. doi:10.1016/j.resp.2007.02.013.
- Buckler, K. J., B. A. Williams, R. V. Orozco & C. N. Wyatt. 2006. "The Role of TASK-like K⁺ Channels in Oxygen Sensing in the Carotid Body." *Novartis Foundation Symposium* 272: 73–85; discussion 85–94, 131–40.
- Campanucci, V.A., S.T. Brown, K. Hudasek, I.M. O'Kelly, C.A. Nurse & I.M. Fearon. 2005. "O₂ Sensing by Recombinant TWIK-Related Halothane-Inhibitable K⁺ Channel-1 Background K⁺ Channels Heterologously Expressed in Human Embryonic Kidney Cells." *Neuroscience* 135 (4): 1087–94. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.07.009.
- Chavez, R. A., A. T. Gray, B. B. Zhao, C. H. Kindler, M. J. Mazurek, Y. Mehta, J. R. Forsayeth & C. S. Yost. 1999. "TWIK-2, a New Weak Inward Rectifying Member of the Tandem Pore Domain Potassium Channel Family." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7887–92.
- Chemin, J., C. Girard, F. Duprat, F. Lesage, G. Romey & M. Lazdunski. 2003. "Mechanisms Underlying Excitatory Effects of Group I Metabotropic Glutamate Receptors via Inhibition of 2P Domain K⁺ Channels." *The EMBO Journal* 22 (20): 5403–11.
- Chemin, J., A. J. Patel, F. Duprat, I. Lauritzen, M. Lazdunski & E. Honore. 2005. "A Phospholipid Sensor Controls Mechanogating of the K⁺ Channel TREK-1." *The EMBO Journal* 24 (1): 44–53.
- Chemin, J., A. J. Patel, F. Duprat, F. Sachs, M. Lazdunski & E. Honore. 2007. "Up- and down-Regulation of the Mechano-Gated K2P Channel TREK-1 by PIP2 and Other Membrane Phospholipids." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 455 (1): 97–103. doi:10.1007/s00424-007-0250-2.
- Chemin, J., A. Patel, F. Duprat, M. Zanzouri, M. Lazdunski & E. Honore. 2005. "Lysophosphatidic Acid-Operated K⁺ Channels." *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4415–21. doi:10.1074/jbc.M408246200.
- Chiabrando, D., F. Vinchi, V. Fiorito, S. Mercurio & E. Tolosano. 2014. "Heme in Pathophysiology: A Matter of Scavenging, Metabolism and Trafficking

- across Cell Membranes." *Frontiers in Pharmacology* 5 (April). doi:10.3389/fphar.2014.00061.
- Choe, S. 2002. "ION CHANNEL STRUCTURE POTASSIUM CHANNEL STRUCTURES." *Nature Reviews Neuroscience* 3 (2): 115–21. doi:10.1038/nrn727.
- Clark, J. E., R. Foresti, P. Sarathchandra, H. Kaur, C. J. Green & R. Motterlini. 2000. "Heme Oxygenase-1-Derived Bilirubin Ameliorates Postischemic Myocardial Dysfunction." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278 (2): H643–51.
- Cohen, A., Y. Ben-Abu, S. Hen & N. Zilberberg. 2008. "A Novel Mechanism for Human K2P2.1 Channel Gating: FACILITATION OF C-TYPE GATING BY PROTONATION OF EXTRACELLULAR HISTIDINE RESIDUES." *Journal of Biological Chemistry* 283 (28): 19448–55. doi:10.1074/jbc.M801273200.
- Comoglio, Y., J. Levitz, M. A. Kienzler, F. Lesage, E. Y. Isacoff & G. Sandoz. 2014. "Phospholipase D2 Specifically Regulates TREK Potassium Channels via Direct Interaction and Local Production of Phosphatidic Acid." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, September. doi:10.1073/pnas.1407160111.
- Czirják, G. & P. Enyedi. 2003. "Ruthenium Red Inhibits TASK-3 Potassium Channel by Interconnecting Glutamate 70 of the Two Subunits." *Molecular Pharmacology* 63 (3): 646–52.
- Czirjak, G. & P. Enyedi. 2002. "Formation of Functional Heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 Two-Pore Domain Potassium Channel Subunits." *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 5426–32. doi:10.1074/jbc.M107138200.
- Dallas, M. L., J. L. Scragg & C. Peers. 2008. "Modulation of hTREK-1 by Carbon Monoxide." *Neuroreport* 19 (3): 345–48.
- Dallas, M. L., J. P. Boyle, C. J. Milligan, R. Sayer, T. L. Kerrigan, C. McKinstry, P. Lu. 2011. "Carbon Monoxide Protects against Oxidant-Induced Apoptosis via Inhibition of Kv2.1." *The FASEB Journal* 25 (5): 1519–30. doi:10.1096/fj.10-173450.
- Decher, N., M. Maier, W. Dittrich, J. Gassenhuber, A. Brüggenmann, A. E. Busch & K. Steinmeyer. 2001. "Characterization of TASK-4, a Novel Member of the pH-Sensitive, Two-Pore Domain Potassium Channel Family." *FEBS Letters* 492 (1-2): 84–89.
- Domachowske, J. B. 1997. "The Role of Nitric Oxide in the Regulation of Cellular Iron Metabolism." *Biochemical and Molecular Medicine* 60 (1): 1–7.
- Doré, S., K. Sampei, S. Goto, N. J. Alkayed, D. Guastella, S. Blackshaw, M. Gallagher. 1999. "Heme Oxygenase-2 Is Neuroprotective in Cerebral Ischemia." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 5 (10): 656–63.
- Doyle, D. A. 1998. "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity." *Science* 280 (5360): 69–77. doi:10.1126/science.280.5360.69.
- Duffy, S. P., J. Shing, P. Saraon, L. C. Berger, M. V. Eiden, A. Wilde & C. S. Tailor. 2010. "The Fowler Syndrome-Associated Protein FLVCR2 Is an Importer of Heme." *Molecular and Cellular Biology* 30 (22): 5318–24. doi:10.1128/MCB.00690-10.
- Duprat, F., F. Lesage, M. Fink, R. Reyes, C. Heurteaux & M. Lazdunski. 1997. "TASK, a Human Background K⁺ Channel to Sense External pH

- Variations near Physiological pH." *The EMBO Journal* 16 (17): 5464–71. doi:10.1093/emboj/16.17.5464.
- Enyeart, J. J., L. Xu, S. Danthi & J. A. Enyeart. 2002. "An ACTH- and ATP-Regulated Background K⁺ Channel in Adrenocortical Cells Is TREK-1." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49186–99. doi:10.1074/jbc.M207233200.
- Enyedi, P. & G. Czirjak. 2010. "Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels." *Physiological Reviews* 90 (2): 559–605. doi:10.1152/physrev.00029.2009.
- Fink, M., F. Duprat, F. Lesage, R. Reyes, G. Romey, C. Heurteaux & M. Lazdunski. 1996. "Cloning, Functional Expression and Brain Localization of a Novel Unconventional Outward Rectifier K⁺ Channel." *The EMBO Journal* 15 (24): 6854–62.
- Fink, M., F. Duprat, F. Lesage, R. Reyes, G. Romey, C. Heurteaux & M. Lazdunski. 1996. "Cloning, Functional Expression and Brain Localization of a Novel Unconventional Outward Rectifier K⁺ Channel." *The EMBO Journal* 15 (24): 6854.
- Fink, M., F. Lesage, F. Duprat, C. Heurteaux, R. Reyes, M. Fosset & M. Lazdunski. 1998. "A Neuronal Two P Domain K⁺ Channel Stimulated by Arachidonic Acid and Polyunsaturated Fatty Acids." *The EMBO Journal* 17 (12): 3297–3308.
- Francis, S. H., J. L. Busch & J. D. Corbin. 2010. "cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action." *Pharmacological Reviews* 62 (3): 525–63. doi:10.1124/pr.110.002907.
- Froese, A., S. S. Breher, C. Waldeyer, R. F.R. Schindler, V. O. Nikolaev, S. Rinné, E. Wischmeyer. 2012. "Popeye Domain Containing Proteins Are Essential for Stress-Mediated Modulation of Cardiac Pacemaking in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 1119–30. doi:10.1172/JCI59410.
- Gardener, M. J., I. T. Johnson, M. P. Burnham, G. Edwards, A. M. Heagerty & A. H. Weston. 2004. "Functional Evidence of a Role for Two-Pore Domain Potassium Channels in Rat Mesenteric and Pulmonary Arteries." *British Journal of Pharmacology* 142 (1): 192–202. doi:10.1038/sj.bjp.0705691.
- Garry, A., B. Fromy, N. Blondeau, D. Henrion, F. Brau, P. Gounon, N. Guy, C. Heurteaux, M. Lazdunski & J. L. Saumet. 2007. "Altered Acetylcholine, Bradykinin and Cutaneous Pressure-Induced Vasodilation in Mice Lacking the TREK1 Potassium Channel: The Endothelial Link." *EMBO Reports* 8 (4): 354–59. doi:10.1038/sj.embor.7400916.
- Girard, C., F. Duprat, C. Terrenoire, N. Tinel, M. Fosset, G. Romey, M. Lazdunski & F. Lesage. 2001. "Genomic and Functional Characteristics of Novel Human Pancreatic 2P Domain K(+) Channels." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282 (1): 249–56. doi:10.1006/bbrc.2001.4562.
- Goonetilleke, L. & J. Quayle. 2012. "TREK-1 K⁺ Channels in the Cardiovascular System: Their Significance and Potential as a Therapeutic Target: TREK-1 K⁺ Channels in the CVS." *Cardiovascular Therapeutics* 30 (1): e23–29. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00227.x.
- Gruss, M., T. J. Bushell, D. P. Bright, W. R. Lieb, A. Mathie & N. P. Franks. 2004. "Two-Pore-Domain K⁺ Channels Are a Novel Target for the

- Anesthetic Gases Xenon, Nitrous Oxide, and Cyclopropane." *Molecular Pharmacology* 65 (2): 443–52.
- Gruss, M., A. Mathie, W. R. Lieb & N. P. Franks. 2004. "The Two-Pore-Domain K⁺ Channels TREK-1 and TASK-3 Are Differentially Modulated by Copper and Zinc." *Molecular Pharmacology* 66 (3): 530–37.
- Guillén, M. I., J. Megías, V. Clérigues, F. Gomar & M. J. Alcaraz. 2008. "The CO-Releasing Molecule CORM-2 Is a Novel Regulator of the Inflammatory Process in Osteoarthritic Chondrocytes." *Rheumatology (Oxford, England)* 47 (9): 1323–28. doi:10.1093/rheumatology/ken264.
- Halliwell, B. & J. M. Gutteridge. 1992. "Biologically Relevant Metal Ion-Dependent Hydroxyl Radical Generation. An Update." *FEBS Letters* 307 (1): 108–12.
- Hanafy, K. A., J. Oh & L. E. Otterbein. 2013. "Carbon Monoxide and the Brain: Time to Rethink the Dogma." *Current Pharmaceutical Design* 19 (15): 2771.
- Hayashi, S., Y. Omata, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, T. Hara, Y. Sagara & M. Noguchi. 2004. "Characterization of Rat Heme Oxygenase-3 Gene. Implication of Processed Pseudogenes Derived from Heme Oxygenase-2 Gene." *Gene* 336 (2): 241–50. doi:10.1016/j.gene.2004.04.002.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy & C. Camaschella. 2010. "Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism." *Cell* 142 (1): 24–38. doi:10.1016/j.cell.2010.06.028.
- Hentze, M. W. & L. C. Kühn. 1996. "Molecular Control of Vertebrate Iron Metabolism: mRNA-Based Regulatory Circuits Operated by Iron, Nitric Oxide, and Oxidative Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8175–82.
- Heurteaux, C., N. Guy, C. Laigle, N. Blondeau, F. Duprat, M. Mazzuca, L. Lang-Lazdunski. 2004. "TREK-1, a K⁺ Channel Involved in Neuroprotection and General Anesthesia." *The EMBO Journal* 23 (13): 2684–95. doi:10.1038/sj.emboj.7600234.
- Honoré, E. 2007. "The Neuronal Background K₂P Channels: Focus on TREK1." *Nature Reviews Neuroscience* 8 (4): 251–61. doi:10.1038/nrn2117.
- Honoré, E., F. Maingret, M. Lazdunski & A. J. Patel. 2002. "An Intracellular Proton Sensor Commands Lipid- and Mechano-Gating of the K⁺ Channel TREK-1." *The EMBO Journal* 21 (12): 2968–76.
- Hou, S., M. F. Reynolds, F. T. Horrigan, S. H. Heinemann & T. Hoshi. 2006. "Reversible Binding of Heme to Proteins in Cellular Signal Transduction." *Accounts of Chemical Research* 39 (12): 918–24. doi:10.1021/ar040020w.
- Hund, T. J., J. S. Snyder, X. Wu, P. Glynn, O. M. K., B. Onal, N. D. Leymaster, S. D. Unudurthi, J. Curran & C. Camardo. 2014. "βIV-Spectrin Regulates TREK-1 Membrane Targeting in Heart." *Cardiovascular Research*, cvu008.
- Ingebritsen, T. S. & P. Cohen. 1983. "Protein Phosphatases: Properties and Role in Cellular Regulation." *Science (New York, N.Y.)* 221 (4608): 331–38.
- Inglis, S. K., S. G. Brown, M. J. Constable, N. McTavish, R.E. Olver & S. M. Wilson. 2007. "A Ba²⁺-Resistant, Acid-Sensitive K⁺ Conductance in Na⁺-Absorbing H441 Human Airway Epithelial Cells." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 292 (5): L1304–12. doi:10.1152/ajplung.00424.2006.

- Innamaa, A., L. Jackson, V. Asher, G. van Schalkwyk, A. Warren, A. Keightley, D. Hay, A. Bali, H. Sowter & R. Khan. 2013. "Expression and Effects of Modulation of the K2P Potassium Channels TREK-1 (KCNK2) and TREK-2 (KCNK10) in the Normal Human Ovary and Epithelial Ovarian Cancer." *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 15 (11): 910–18. doi:10.1007/s12094-013-1022-4.
- Ishikawa, K. 1998. "Identification of Histidine 45 as the Axial Heme Iron Ligand of Heme Oxygenase-2." *Journal of Biological Chemistry* 273 (8): 4317–22. doi:10.1074/jbc.273.8.4317.
- Jaggar, J. H., A. Li, H. Parfenova, J. Liu, E. S. Umstot, A. M. Dopico & Charles W. Leffler. 2005. "Heme Is a Carbon Monoxide Receptor for Large-Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels." *Circulation Research* 97 (8): 805–12. doi:10.1161/01.RES.0000186180.47148.7b.
- Kang, D., E. Mariash & D. Kim. 2004. "Functional Expression of TREK-2, a New Member of the Tandem-Pore K^{+} Channel Family." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (27): 28063–70. doi:10.1074/jbc.M402940200.
- Kappas, A. 2004. "A Method for Interdicting the Development of Severe Jaundice in Newborns by Inhibiting the Production of Bilirubin." *Pediatrics* 113 (1 Pt 1): 119–23.
- Kelly, D., L. Mackenzie, P. Hunter, B. Smaill & D. A. Saint. 2006. "Gene Expression of Stretch-Activated Channels and Mechanoelectric Feedback in the Heart." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33 (7): 642–48.
- Kennard, L. E., J. R. Chumbley, K. M. Ranatunga, S. J. Armstrong, E. L. Veale & A. Mathie. 2005. "Inhibition of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel, TREK-1, by Fluoxetine and Its Metabolite Norfluoxetine." *British Journal of Pharmacology* 144 (6): 821–29. doi:10.1038/sj.bjp.0706068.
- Ketchum, K. A., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek & S. A. Goldstein. 1995. "A New Family of Outwardly Rectifying Potassium Channel Proteins with Two Pore Domains in Tandem." *Nature* 376 (6542): 690–95. doi:10.1038/376690a0.
- Kim, D. & C. Gnatenco. 2001. "TASK-5, a New Member of the Tandem-Pore K^{+} Channel Family." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284 (4): 923–30. doi:10.1006/bbrc.2001.5064.
- Kim, Y., H. Bang & D. Kim. 2000. "TASK-3, a New Member of the Tandem Pore K^{+} Channel Family." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9340–47.
- Kim, Y. & S. Doré. 2005. "Catalytically Inactive Heme Oxygenase-2 Mutant Is Cytoprotective." *Free Radical Biology and Medicine* 39 (4): 558–64. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.009.
- Klingbeil, P., G. Frazzetto & T. Bouwmeester. 2001. "Xgravin-like (Xgl), a Novel Putative α -Kinase Anchoring Protein (AKAP) Expressed during Embryonic Development in *Xenopus*." *Mechanisms of Development* 100 (2): 323–26. doi:10.1016/S0925-4773(00)00527-X.
- Kocher V. 2012. "Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem Kaliumkanal TREK-1 und Hämoxxygenasen". (Dissertation)
- Koh, S. D., K. Monaghan, G. P. Sergeant, S. Ro, R. L. Walker, K. M. Sanders & B. Horowitz. 2001. "TREK-1 Regulation by Nitric Oxide and cGMP-Dependent Protein Kinase. AN ESSENTIAL ROLE IN SMOOTH MUSCLE INHIBITORY NEUROTRANSMISSION." *Journal of Biological*

- Chemistry* 276 (47): 44338–46. doi:10.1074/jbc.M108125200.
- Koschinsky, K. 2010. "Charakterisierung von Interaktionspartnern des humanen K₂P-Kanals TREK-1". (Diplomarbeit)
- Kreneisz, O., J. P. Benoit, D. A. Bayliss & D. K. Mulkey. 2009. "AMP-Activated Protein Kinase Inhibits TREK Channels." *The Journal of Physiology* 587 (24): 5819–30. doi:10.1113/jphysiol.2009.180372.
- Kushida, T., G. LiVolti, A. I. Goodman & N. G. Abraham. 2002. "TNF-Alpha-Mediated Cell Death Is Attenuated by Retrovirus Delivery of Human Heme Oxygenase-1 Gene into Human Microvessel Endothelial Cells." *Transplantation Proceedings* 34 (7): 2973–78.
- Lauritzen, I., J. Chemin, E. Honoré, M. Jodar, N. Guy, M. Lazdunski & A. J. Patel. 2005. "Cross-Talk between the Mechano-Gated K₂P Channel TREK-1 and the Actin Cytoskeleton." *EMBO Reports* 6 (7): 642–48. doi:10.1038/sj.embor.7400449.
- Lee, S. & R. MacKinnon. 2004. "A Membrane-Access Mechanism of Ion Channel Inhibition by Voltage Sensor Toxins from Spider Venom." *Nature* 430 (6996): 232–35. doi:10.1038/nature02632.
- Leffler, C. W., H. Parfenova, and J. H. Jaggar. 2011. "Carbon Monoxide as an Endogenous Vascular Modulator." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 301 (1): H1–11. doi:10.1152/ajpheart.00230.2011.
- Lesage, F. & Michel Lazdunski. 2000. "Molecular and Functional Properties of Two-Pore-Domain Potassium Channels." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 279 (5): F793–801.
- Lesage, F., F. Maingret & M. Lazdunski. 2000. "Cloning and Expression of Human TRAAK, a Polyunsaturated Fatty Acids-Activated and Mechano-Sensitive K(+) Channel." *FEBS Letters* 471 (2-3): 137–40.
- Lesage, F., C. Terrenoire, G. Romey & M. Lazdunski. 2000. "Human TREK2, a 2P Domain Mechano-Sensitive K⁺ Channel with Multiple Regulations by Polyunsaturated Fatty Acids, Lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq Protein-Coupled Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 28398–405. doi:10.1074/jbc.M002822200.
- Li X. T., V Dyachenko, M. Zuzarte, C. Putzke, R. Preisigmuller, G. Isenberg & J. Daut. 2006a. "The Stretch-Activated Potassium Channel TREK-1 in Rat Cardiac Ventricular Muscle." *Cardiovascular Research* 69 (1): 86–97. doi:10.1016/j.cardiores.2005.08.018.
- Liang, S., Q. Wang, W. Zhang, H. Zhang, S. Tan, A. Ahmed & Y. Gu. 2014. "Carbon Monoxide Inhibits Inward Rectifier Potassium Channels in Cardiomyocytes." *Nature Communications* 5 (August). doi:10.1038/ncomms5676.
- Lim, I. 2005. "Carbon Monoxide Activates Human Intestinal Smooth Muscle L-Type Ca²⁺ Channels through a Nitric Oxide-Dependent Mechanism." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 288 (1): G7–14. doi:10.1152/ajpgi.00205.2004.
- Liu, H., J. A. Enyeart & J. J. Enyeart. 2008. "ACTH Inhibits bTREK-1 K⁺ Channels through Multiple cAMP-Dependent Signaling Pathways." *The Journal of General Physiology* 132 (2): 279–94. doi:10.1085/jgp.200810003.
- Liu, N., X. Wang, W. K. McCoubrey Jr & M. D. Maines. 2000. "Developmentally Regulated Expression of Two Transcripts for Heme Oxygenase-2 with a First Exon Unique to Rat Testis: Control by Corticosterone of the Oxygenase Protein Expression." *Gene* 241 (1): 175–83.

- Liu, W. & D. A. Saint. 2004. "Heterogeneous Expression of Tandem-Pore K⁺ Channel Genes in Adult and Embryonic Rat Heart Quantified by Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 31 (3): 174–78.
- Li, X. & J. D. Clark. 2000. "Chronic Morphine Exposure and the Expression of Heme Oxygenase Type 2." *Molecular Brain Research* 75 (2): 179–84.
- Lopes, Coeli MB, Juan I. Remon, Alessandra Matavel, Jin Liang Sui, Inna Keselman, Emiliano Medei, Yuming Shen, Avia Rosenhouse-Dantsker, Tibor Rohacs & Diomedes E. Logothetis. 2007. "Protein Kinase A Modulates PLC-Dependent Regulation and PIP." *Channels* 1 (2): 124–34.
- Lugnier, C. 2006. "Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) Superfamily: A New Target for the Development of Specific Therapeutic Agents." *Pharmacology & Therapeutics* 109 (3): 366–98.
doi:10.1016/j.pharmthera.2005.07.003.
- Maines, M. D. 1997. "The Heme Oxygenase System: A Regulator of Second Messenger Gases." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37 (1): 517–54.
- Maingret, F. 2000. "Lysophospholipids Open the Two-Pore Domain Mechano-Gated K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK." *Journal of Biological Chemistry* 275 (14): 10128–33. doi:10.1074/jbc.275.14.10128.
- Maingret, F., I. Lauritzen, A. J. Patel, C. Heurteaux, R. Reyes, F. Lesage, M. Lazdunski & E. Honoré. 2000. "TREK-1 Is a Heat-Activated Background K(+) Channel." *The EMBO Journal* 19 (11): 2483–91.
doi:10.1093/emboj/19.11.2483.
- Maingret, F., A.J. Patel, F. Lesage, M. Lazdunski & E. Honoré. 1999. "Mechano-or Acid Stimulation, Two Interactive Modes of Activation of the TREK-1 Potassium Channel." *Journal of Biological Chemistry* 274 (38): 26691–96.
- Mazella, J., O. Pétrault, G. Lucas, E. Deval, S. Béraud-Dufour, C. Gandin, M. El-Yacoubi. 2010. "Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design." Edited by E. Nestler. *PLoS Biology* 8 (4): e1000355.
doi:10.1371/journal.pbio.1000355.
- McCoubrey, W. K., B. Eke & M. D. Maines. 1995. "Multiple Transcripts Encoding Heme Oxygenase-2 in Rat Testis: Developmental and Cell-Specific Regulation of Transcripts and Protein." *Biology of Reproduction* 53 (6): 1330–38.
- McCoubrey, W. K., T. J. Huang & M. D. Maines. 1997. "Isolation and Characterization of a cDNA from the Rat Brain That Encodes Hemoprotein Heme Oxygenase-3." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 247 (2): 725–32.
- Meadows, H. J., C. D. Benham, W. Cairns, I. Gloger, C. Jennings, A. D. Medhurst, P. Murdock and C. G. Chapman. 2000. "Cloning, Localisation and Functional Expression of the Human Orthologue of the TREK-1 Potassium Channel." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 439 (6): 714–22.
- Medhurst, A. D., G. Rennie, C. G. Chapman, H. Meadows, M. D. Duckworth, R. E. Kelsell, I. I. Gloger & M. N. Pangalos. 2001. "Distribution Analysis of Human Two Pore Domain Potassium Channels in Tissues of the Central

- Nervous System and Periphery." *Brain Research. Molecular Brain Research* 86 (1-2): 101–14.
- Miki, H. & Y. Funato. 2012. "Regulation of Intracellular Signalling through Cysteine Oxidation by Reactive Oxygen Species." *Journal of Biochemistry* 151 (3): 255–61. doi:10.1093/jb/mvs006.
- Miller, A. N. & S. B. Long. 2012. "Crystal Structure of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel K2P1." *Science* 335 (6067): 432–36. doi:10.1126/science.1213274.
- Miller, P. 2004. "Polymodal Regulation of hTREK1 by pH, Arachidonic Acid, and Hypoxia: Physiological Impact in Acidosis and Alkalosis." *AJP: Cell Physiology* 286 (2): 272C – 282. doi:10.1152/ajpcell.00334.2003.
- Mohammedi, H., J. Veyssiere, F. Labbal, T. Coppola, C. Gandin, C. Widmann, J. Mazella, C. Heurteaux & M. Borsotto. 2012. "Spadin as a New Antidepressant: Absence of TREK-1-Related Side Effects." *Neuropharmacology* 62 (1): 278–88. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.019.
- Motterlini, R., J. E. Clark, R. Foresti, P. Sarathchandra, B. E. Mann & C. J. Green. 2002. "Carbon Monoxide-Releasing Molecules: Characterization of Biochemical and Vascular Activities." *Circulation Research* 90 (2): E17–24.
- Muñoz-Sánchez, J. & M. E. Cháñez-Cárdenas. 2014. "A Review on Hemeoxygenase-2: Focus on Cellular Protection and Oxygen Response." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1–16. doi:10.1155/2014/604981.
- Murbartian, J., Q. Lei, J. Sando & D. Bayliss. 2005. "Sequential Phosphorylation Mediates Receptor- and Kinase-Induced Inhibition of TREK-1 Background Potassium Channels." *Journal of Biological Chemistry* 280 (34): 30175–84. doi:10.1074/jbc.M503862200.
- Murray, A. J. 2008. "Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems." *Science Signaling* 1 (22): re4. doi:10.1126/scisignal.122re4.
- Musameh, M. D., B. J. Fuller, B. E. Mann, C. J. Green & R. Motterlini. 2006. "Positive Inotropic Effects of Carbon Monoxide-Releasing Molecules (CO-RMs) in the Isolated Perfused Rat Heart." *British Journal of Pharmacology* 149 (8): 1104–12. doi:10.1038/sj.bjp.0706939.
- Ndisang, J. F., H. E. N. Tabien & R. Wang. 2004. "Carbon Monoxide and Hypertension." *Journal of Hypertension* 22 (6): 1057–74.
- Nobre, L. S., J. D. Seixas, C. C. Romão & L. M. Saraiva. 2007. "Antimicrobial Action of Carbon Monoxide-Releasing Compounds." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (12): 4303–7. doi:10.1128/AAC.00802-07.
- Noël, J., G. Sandoz & F. Lesage. 2011. "Molecular Regulations Governing TREK and TRAAK Channel Functions." *Channels (Austin, Tex.)* 5 (5): 402–9. doi:10.4161/chan.5.5.16469.
- Ogawa, K., J. Sun, S. Taketani, O. Nakajima, C. Nishitani, S. Sassa, N. Hayashi. 2001. "Heme Mediates Derepression of Maf Recognition Element through Direct Binding to Transcription Repressor Bach1." *The EMBO Journal* 20 (11): 2835–43. doi:10.1093/emboj/20.11.2835.
- Ollinger, R., K. Yamashita, M. Bilban, A. Erat, P. Kogler, M. Thomas, E. Csizmadia, A. Usheva, R. Margreiter & F. H. Bach. 2007. "Bilirubin and Biliverdin Treatment of Atherosclerotic Diseases." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (1): 39–43.

- Otterbein, L. E., F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell & A. M. Choi. 2000. "Carbon Monoxide Has Anti-Inflammatory Effects Involving the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway." *Nature Medicine* 6 (4): 422–28. doi:10.1038/74680.
- Otterbein, L. E., S. L. Otterbein, E. Ifedigbo, F. Liu, D. E. Morse, C. Fearn, R. J. Ulevitch, R. Knickelbein, R. A. Flavell & A. M. Choi. 2003. "MKK3 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Mediates Carbon Monoxide-Induced Protection against Oxidant-Induced Lung Injury." *The American Journal of Pathology* 163 (6): 2555–63. doi:10.1016/S0002-9440(10)63610-3.
- Patel, A. J., E. Honoré, F. Maingret, F. Lesage, M. Fink, F. Duprat & M. Lazdunski. 1998. "A Mammalian Two Pore Domain Mechano-Gated S-like K⁺ Channel." *The EMBO Journal* 17 (15): 4283–90.
- Peers, C., J. P. Boyle, J. L. Scragg, M. L. Dallas, M. M. Al-Owais, N.T. Hettiarachichi, J. Elies, E. Johnson, N. Gamper & D. S. Steele. 2014. "Diverse Mechanisms Underlying the Regulation of Ion Channels by Carbon Monoxide: CO Modulation of Ion Channels." *British Journal of Pharmacology*, May, n/a – n/a. doi:10.1111/bph.12760.
- Peers, C. & D. S. Steele. 2012. "Carbon Monoxide: A Vital Signalling Molecule and Potent Toxin in the Myocardium." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52 (2): 359–65. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.05.013.
- Ponka, P., C. Beaumont & D. R. Richardson. 1998. "Function and Regulation of Transferrin and Ferritin." *Seminars in Hematology* 35 (1): 35–54.
- Prabhakar, N., J. L. Dinerman, F. H. Agani & S. H. Snyder. 1995. "Carbon Monoxide: A Role in Carotid Body Chemoreception." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (6): 1994–97.
- Rajan, S., E. Wischmeyer, C. Karschin, R. Preisig-Müller, K. H. Grzeschik, J. Daut, A. Karschin & C. Derst. 2001. "THIK-1 and THIK-2, a Novel Subfamily of Tandem Pore Domain K⁺ Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 7302–11. doi:10.1074/jbc.M008985200.
- Renigunta, V., G. Schlichthörl & J. Daut. 2015. "Much More than a Leak: Structure and Function of K2P-Channels." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, March. doi:10.1007/s00424-015-17037.
- Rinné, S., V. Renigunta, G. Schlichthörl, M. Zuzarte, S. Bittner, S. G. Meuth, N. Decher, J. Daut & R. Preisig-Müller. 2013. "A Splice Variant of the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 with Only One Pore Domain Reduces the Surface Expression of Full-Length TREK-1 Channels." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, November. doi:10.1007/s00424-013-1384-z.
- Rodgers, P. A., H. J. Vreman, P. A. Dennery & D. K. Stevenson. 1994. "Sources of Carbon Monoxide (CO) in Biological Systems and Applications of CO Detection Technologies." *Seminars in Perinatology* 18 (1): 2–10.
- Rodkey, F. L., J. D. O'Neal, H. A. Collison & D. E. Uddin. 1974. "Relative Affinity of Hemoglobin S and Hemoglobin A for Carbon Monoxide and Oxygen." *Clinical Chemistry* 20 (1): 83–84.
- Rosa, A. O., S. Movafagh, L. Cleemann & M. Morad. 2012. "Hypoxic Regulation of Cardiac Ca²⁺ Channel: Possible Role of Haem Oxygenase." *The Journal of Physiology* 590 (17): 4223–37. doi:10.1113/jphysiol.2012.236570.

- Ryter, S. W. 2006. "Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications." *Physiological Reviews* 86 (2): 583–650. doi:10.1152/physrev.00011.2005.
- Salinas, M., R. Reyes, F. Lesage, M. Fosset, C. Heurteaux, G. Romey & M. Lazdunski. 1999. "Cloning of a New Mouse Two-P Domain Channel Subunit and a Human Homologue with a Unique Pore Structure." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (17): 11751–60.
- Sanders, K. M. & S. D. Koh. 2006. "Two-Pore-Domain Potassium Channels in Smooth Muscles: New Components of Myogenic Regulation." *The Journal of Physiology* 570 (Pt 1): 37–43. doi:10.1113/jphysiol.2005.098897.
- Sandoz, G., M. P. Tardy, S. Thummler, S. Feliciangeli, M. Lazdunski & F. Lesage. 2008. "Mtap2 Is a Constituent of the Protein Network That Regulates Twik-Related K⁺ Channel Expression and Trafficking." *Journal of Neuroscience* 28 (34): 8545–52. doi:10.1523/JNEUROSCI.1962-08.2008.
- Sandoz, G., D. Douguet, F. Chatelain, M. Lazdunski & F. Lesage. 2009. "Extracellular Acidification Exerts Opposite Actions on TREK1 and TREK2 Potassium Channels via a Single Conserved Histidine Residue." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (34): 14628–33.
- Sandoz, G., S. Thümmel, F. Duprat, S. Feliciangeli, J. Vinh, P. Escoubas, N. Guy, M. Lazdunski & F. Lesage. 2006. "AKAP150, a Switch to Convert Mechano-, pH- and Arachidonic Acid-Sensitive TREK K⁺ Channels into Open Leak Channels." *The EMBO Journal* 25 (24): 5864–72.
- Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, C. Kitada, H. Yokoi, K. Nozawa, H. Okada, H. Matsushime & K. Furuichi. 2003. "A Novel Two-Pore Domain K⁺ Channel, TRESK, Is Localized in the Spinal Cord." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (30): 27406–12. doi:10.1074/jbc.M206810200.
- Schmidt, D. & R. MacKinnon. 2008. "Voltage-Dependent K⁺ Channel Gating and Voltage Sensor Toxin Sensitivity Depend on the Mechanical State of the Lipid Membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (49): 19276–81.
- Scragg, J. L., M. L. Dallas, J. A. Wilkinson, G. Varadi & C. Peers. 2008. "Carbon Monoxide Inhibits L-Type Ca²⁺ Channels via Redox Modulation of Key Cysteine Residues by Mitochondrial Reactive Oxygen Species." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (36): 24412–19. doi:10.1074/jbc.M803037200.
- Sedlak, T. W. & S. H. Snyder. 2004. "Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle." *Pediatrics* 113 (6): 1776–82.
- Shibahara, S., F. Han, B. Li & K. Takeda. 2007. "Hypoxia and Heme Oxygenases: Oxygen Sensing and Regulation of Expression." *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (12): 2209–25. doi:10.1089/ars.2007.1784.
- Shih, M., F. Lin, J. D. Scott, H.-y. Wang & C. C. Malbon. 1999. "Dynamic Complexes of 2-Adrenergic Receptors with Protein Kinases and Phosphatases and the Role of Gravin." *Journal of Biological Chemistry* 274 (3): 1588–95. doi:10.1074/jbc.274.3.1588.
- Sitdikova, G. F., R. R. Islamov, M. A. Mukhamedyarov, V. V. Permyakova, A. L. Zefirov & A. Palotás. 2007. "Modulation of Neurotransmitter Release by

- Carbon Monoxide at the Frog Neuro-Muscular Junction." *Current Drug Metabolism* 8 (2): 177–84.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer & B. N. Ames. 1987. "Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance." *Science (New York, N.Y.)* 235 (4792): 1043–46.
- Stone, J. R. & M. A. Marletta. 1994. "Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States." *Biochemistry* 33 (18): 5636–40.
- Suchyna, T. M., S. E. Tape, R. E. Koeppe, O.S. Andersen, F. Sachs & P. A. Gottlieb. 2004. "Bilayer-Dependent Inhibition of Mechanosensitive Channels by Neuroactive Peptide Enantiomers." *Nature* 430 (6996): 235–40. doi:10.1038/nature02743.
- Talley, E. M., G. Solorzano, Q. Lei, D. Kim & D. A. Bayliss. 2001. "Cns Distribution of Members of the Two-Pore-Domain (KCNK) Potassium Channel Family." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (19): 7491–7505.
- Tang, X. D., R. Xu, M. F. Reynolds, M. L. Garcia, S. H. Heinemann & T. Hoshi. 2003. "Haem Can Bind to and Inhibit Mammalian Calcium-Dependent Slo1 BK Channels." *Nature* 425 (6957): 531–35. doi:10.1038/nature02003.
- Telezhkin, V., S. P. Brazier, R. Mears, C. T. Müller, D. Riccardi & P. J. Kemp. 2011. "Cysteine Residue 911 in C-Terminal Tail of Human BKCa α Channel Subunit Is Crucial for Its Activation by Carbon Monoxide." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 461 (6): 665–75. doi:10.1007/s00424-011-0924-7.
- Terrenoire, C., I. Lauritzen, F. Lesage, G. Romey & M. Lazdunski. 2001. "A TREK-1-Like Potassium Channel in Atrial Cells Inhibited by α -Adrenergic Stimulation and Activated by Volatile Anesthetics." *Circulation Research* 89 (4): 336–42. doi:10.1161/hh1601.094979.
- Thomas, D., L. D. Plant, C. M. Wilkens, Z. A. McCrossan & S. A.N. Goldstein. 2008. "Alternative Translation Initiation in Rat Brain Yields K2P2.1 Potassium Channels Permeable to Sodium." *Neuron* 58 (6): 859–70. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.016.
- Tichenor, Je.N., E.T. Hansen & I. L. O. Buxton. 2005. "Expression of Stretch-Activated Potassium Channels in Human Myometrium." *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 48: 44–48.
- Trakshel, G. M., R. K. Kutty & M. D. Maines. 1986. "Purification and Characterization of the Major Constitutive Form of Testicular Heme Oxygenase. The Noninducible Isoform." *The Journal of Biological Chemistry* 261 (24): 11131–37.
- Tschugguel, W., F. Stonek, Z. Zhegu, W. Dietrich, C. Schneeberger, T. Stimpfl, T. Waldhoer, W. Vycudilik & J. C. Huber. 2001. "Estrogen Increases Endothelial Carbon Monoxide, Heme Oxygenase 2, and Carbon Monoxide-Derived cGMP by a Receptor-Mediated System." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (8): 3833–39. doi:10.1210/jcem.86.8.7715.
- Turner, P. J. & K. J. Buckler. 2013. "Oxygen and Mitochondrial Inhibitors Modulate Both Monomeric and Heteromeric TASK-1 and TASK-3 Channels in Mouse Carotid Body Type-1 Cells." *The Journal of Physiology* 591 (23): 5977–98. doi:10.1113/jphysiol.2013.262022.

- Veale, E. L., E. Al-Moubarak, N. Bajaria, K. Omoto, L. Cao, S. J. Tucker, E. B. Stevens & A. Mathie. 2014. "Influence of the N Terminus on the Biophysical Properties and Pharmacology of TREK1 Potassium Channels." *Molecular Pharmacology* 85 (5): 671–81. doi:10.1124/mol.113.091199.
- Veale, E. L., K. A. Rees, A. Mathie & S. Trapp. 2010. "Dominant Negative Effects of a Non-Conducting TREK1 Splice Variant Expressed in Brain." *Journal of Biological Chemistry* 285 (38): 29295–304. doi:10.1074/jbc.M110.108423.
- Vega-Saenz de Miera, E., D. H. Lau, M. Zhadina, D. Pountney, W. A. Coetzee & B. Rudy. 2001. "KT3.2 and KT3.3, Two Novel Human Two-Pore K(+) Channels Closely Related to TASK-1." *Journal of Neurophysiology* 86 (1): 130–42.
- Verma, A.D. J. Hirsch, C. E. Glatt, G. V. Ronnett & S. H. Snyder. 1993. "Carbon Monoxide: A Putative Neural Messenger." *Science* 259 (5093): 381–84.
- Vile, G. F. and R. M. Tyrrell. 1993. "Oxidative Stress Resulting from Ultraviolet A Irradiation of Human Skin Fibroblasts Leads to a Heme Oxygenase-Dependent Increase in Ferritin." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (20): 14678–81.
- Vogt, B. A., J. Alam, A. J. Croatt, G. M. Vercellotti & K. A. Nath. 1995. "Acquired Resistance to Acute Oxidative Stress. Possible Role of Heme Oxygenase and Ferritin." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 72 (4): 474–83.
- Voloshyna, I., A. Besana, M. Castillo, T. Matos, I. B. Weinstein, M. Mansukhani, R. B. Robinson, C. Cordon-Cardo & S. J. Feinmark. 2008. "TREK-1 Is a Novel Molecular Target in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68 (4): 1197–1203. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5163.
- Vukomanovic, D., M. N. Rahman, Y. Bilokin, A. G. Golub, J. F. Brien, W. A. Szarek, Z. Jia & K. Nakatsu. 2014. "In Vitro Activation of Heme Oxygenase-2 by Menadione and Its Analogs." *Medical Gas Research* 4 (1): 4.
- Wagener, F. A. D. T. G. 2003. "Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System in Inflammation." *Pharmacological Reviews* 55 (3): 551–71. doi:10.1124/pr.55.3.5.
- Weinrich, M. & D. L. Worcester. 2013. "Xenon and Other Volatile Anesthetics Change Domain Structure in Model Lipid Raft Membranes." *The Journal of Physical Chemistry B* 117 (50): 16141–47. doi:10.1021/jp411261g.
- Wilkinson, W. J., H. C. Gadeberg, A. W. J. Harrison, N. D. Allen, D. Riccardi & P. J. Kemp. 2009. "Carbon Monoxide Is a Rapid Modulator of Recombinant and Native P2X(2) Ligand-Gated Ion Channels." *British Journal of Pharmacology* 158 (3): 862–71. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00354.x.
- Wilkinson, W. J. & P. J. Kemp. 2011. "Carbon Monoxide: An Emerging Regulator of Ion Channels." *The Journal of Physiology* 589 (13): 3055–62. doi:10.1113/jphysiol.2011.206706.
- Williams, S. E. J. 2004. "Hemoxygenase-2 Is an Oxygen Sensor for a Calcium-Sensitive Potassium Channel." *Science* 306 (5704): 2093–97. doi:10.1126/science.1105010.
- Winburn, I. C., K. Gunatunga, R. D. McKernan, R. J. Walker, I. A. Sammut & J. C. Harrison. 2012. "Cell Damage Following Carbon Monoxide Releasing Molecule Exposure: Implications for Therapeutic Applications." *Basic &*

- Clinical Pharmacology & Toxicology* 111 (1): 31–41. doi:10.1111/j.1742-7843.2012.00856.x.
- Wong, R. J., H. J. Vreman, S. Schulz, F. S. Kalish, N. W. Pierce & D. K. Stevenson. 2011. "In Vitro Inhibition of Heme Oxygenase Isoenzymes by Metalloporphyrins." *Journal of Perinatology* 31 (April): S35–41. doi:10.1038/jp.2010.173.
- Wong, W. & J. D. Scott. 2004a. "AKAP Signalling Complexes: Focal Points in Space and Time." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (12): 959–70. doi:10.1038/nrm1527.
- Yamamoto, Y. 2006. "Expression of Tandem P Domain K⁺ Channel, TREK-1, in the Rat Carotid Body." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54 (4): 467–72. doi:10.1369/jhc.5A6755.2005.
- Yi, L., P. M. Jenkins, L. I. Leichert, U. Jakob, J. R. Martens & S. W. Ragsdale. 2009. "Heme Regulatory Motifs in Heme Oxygenase-2 Form a Thiol/Disulfide Redox Switch That Responds to the Cellular Redox State." *Journal of Biological Chemistry* 284 (31): 20556–61. doi:10.1074/jbc.M109.015651.
- Yoneyama-Sarnecky, T., A. D. Olivas, S. Azari, D. M. F., H. M. Manvelyan & L. J. Noble-Haeusslein. 2010. "Heme Oxygenase-2 Modulates Early Pathogenesis after Traumatic Injury to the Immature Brain." *Developmental Neuroscience* 32 (1): 81–90. doi:10.1159/000258700.
- Zhang, L. & L. Guarente. 1995. "Heme Binds to a Short Sequence That Serves a Regulatory Function in Diverse Proteins." *The EMBO Journal* 14 (2): 313–20.
- Zhou, M., G. Xu, M. Xie, X. Zhang, G. P. Schools, L. Ma, H. K. Kimelberg & H. Chen. 2009. "TWIK-1 and TREK-1 Are Potassium Channels Contributing Significantly to Astrocyte Passive Conductance in Rat Hippocampal Slices." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (26): 8551–64. doi:10.1523/JNEUROSCI.5784-08.2009.
- Zhuang, H., S. Pin, X. Li & S. Doré. 2003. "Regulation of Heme Oxygenase Expression by Cyclopentenone Prostaglandins." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 228 (5): 499–505.
- Zuckerbraun, B. S., B. Y. Chin, M. Bilban, J. de Costa d' Avila, J. Rao, T. R. Billiar & L. E. Otterbein. 2007. "Carbon Monoxide Signals via Inhibition of Cytochrome c Oxidase and Generation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (4): 1099–1106. doi:10.1096/fj.06-6644com.

9. Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATI	alternative Translationsinitiation
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Startcodon
Aqua dest	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus, CT, COOH	Carboxylterminus
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CORM	<i>CO-releasing molecule</i>
cRNA	komplementäre RNA
D	Aspartat
DAG	Diacylglycerol
DMEM	“Dulbecco`s modified Eagle`s Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EPAC	<i>exchange proteins activated by cAMP</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Phenylalanin
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	human
HA	Hämagglutinin
HCL	Salzsäure
HeLa	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzelllinie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
	Natriumsalz
HO	Hämoxygenase

HO-1	Hämoxygenase 1
HO-2	Hämoxygenase 2
HO-3	Hämoxygenase 3
HRM	Hämregulatorisches Motiv
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ₂ P	Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
-LW	ohne Leucin und Tryptophan
-LWHA	ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin
L	Lysin
LB	Lysogeny Broth
LiOAc	Lithiumacetat
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N-Terminus, NT, NH ₂	Aminoterminus
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
P	porenbildende Region
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
r	Ratte
RLU/s	relative Lichteinheit pro Sekunde
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Serin
SD	„synthetic dropout“ (Minimalmedium für Hefen)
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i>
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	<i>sodium nitroprusside</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
TM	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegmente
TPA	Tetrapentylammonium
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TWEEN-20	Polyethylenglycosorbitanmonolaurat

WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Y	Tyrosin
YPD	“Yeast Proteome Database” (Hefemedium)
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnPP	Zinkprotoporphyrin

Nicht aufgeführt sind:

- Die Formelzeichen des Internationalen Einheitensystems (SI) und deren abgeleitete Einheiten.
- Die Abkürzungen für chemische Elemente. Sie entsprechen den Angaben des Periodensystems der Elemente nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
- Allgemein gebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache nach dem Duden.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb.	Bildunterschrift	Seite
1.1	Topologie der 3 Hauptklassen der Kaliumkanäle	1
1.2	Phylogenetischer Stammbaum der humanen K _{2P} -Kanäle	2
1.3	Allgemeine Struktur der K _{2P} -Kanäle	3
1.4	Regulationsmechanismen des TREK-1	8
1.5	Modulation von TREK-1 durch Phosphorylierung	10
1.6	Schematische Darstellung des Häm-Katabolismus	14
1.7	Gegenüberstellung der Primärstruktur von HO-1 und HO-2	17
2.1	Spannungsprotokoll zur Strommessung von TREK Kanälen in Voltage-Clamp Messungen	37
2.2	Spannungsprotokoll zur Strommessung von TREK Kanälen in Giant-Patches	39
2.3	Spannungsprotokoll zur Strommessung von TREK Kanälen in Patch-Clamp Messungen	40
2.4	Strukturformel der CO-freisetzenden Moleküle CORM-2 und CORM-S1	41
2.5	Assay zur Quantifizierung der Oberflächenexpression in <i>Xenopus</i> Oozyten – Schematische Darstellung	44
2.6	Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems – schematische Darstellung	55
3.1	Westernblots nach Koimmunopräzipitation von TREK-1 und HO-2	59
3.2	Sequenzvergleich zwischen HO-2 und HO-1	60
3.3	Direkte Interaktion von TREK-1 und HO-2 Mutanten im Hefe-Zwei-Hybrid-System	61
3.4	Strommessungen von TREK-1 mit HO-2 und HO-2 ^{H45N} in <i>Xenopus</i> Oozyten	62
3.5	Oberflächenexpression von TREK-1 mit HO-2 und HO-2 ^{H45N} in <i>Xenopus</i> Oozyten	63

Abb.	Bildunterschrift	Seite
3.6	Expressionsanalyse von HO-2 in <i>Xenopus</i> Oozyten	63
3.7	Strommessungen von TREK-1 mit HO-2 und HO-2 ^{H45N} in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe von Hämin	65
3.8	Strommessungen von TREK-1 mit HO-2 und HO-2 ^{H45N} in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe von ZnPP und ZnCl ₂	67
3.9	Aktivierung von TREK-1 Kanälen in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe von CORMs und CO-Gas	69
3.10	Aktivierung von TREK-1 Kanälen in HEK293 Zellen nach Zugabe von CORM-2	70
3.11	Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c ^{S362A} und TREK-1c ^{S362D} in <i>Xenopus</i> Oozyten und HEK293 Zellen nach Zugabe des CO-Donators CORM-2	72
3.12	Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c ^{C376S} und TREK-1c ^{C410S} in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe des CO-Donators CORM-2	74
3.13	Untersuchungen von TREK-1, TREK-1 ^{S344A} und TREK-1 ^{S344D} in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe des PKA-Inhibitors H89	75
3.14	Untersuchungen von TREK-1, TREK-1 ^{S344A} und TREK-1 ^{S344D} in <i>Xenopus</i> Oozyten und HEK293 Zellen nach Zugabe des CO-Donators CORM-2	77
3.15	Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c ^{ΔCT} und TREK-1c ^{ΔNT} in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe des CO-Donators CORM-2	79
3.16	Einfluss von NO auf TREK-1-Kanäle und TREK-1-Mutanten in <i>Xenopus</i> Oozyten	81
3.17	Giant-Patch Messungen von TREK-1 Kanälen in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe von CORM-2	83
3.18	Untersuchungen von TREK-1c, TREK-1c ^{C104A} , TREK-1c ^{C170A} und TREK-1c ^{C230A} in <i>Xenopus</i> Oozyten nach Zugabe des CO-Donators CORM-2	85
3.19	Strommessungen weiterer Kaliumkanäle nach Zugabe von CORM-2	86
4.1	Schematische Darstellung diverser CO-regulierter Signalwege und deren Einfluss auf Ionenkanäle	94

10.1 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen aus der Arbeit entfernt.

10.2 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen:

Anders, C.*, Higuchi, Y.*, **Koschinsky, K.***, Bartel, M., Schumacher, B., Thiel, P., Nitta, H., Preisig-Müller, R., Schlichthörl, G., Renigunta, V., Ohkanda, J., Daut, J., Kato, N. & Ottmann, C. 2013. A Semisynthetic Fusicoccane Stabilizes a Protein-Protein Interaction and Enhances the Expression of K⁺ Channels at the Cell Surface. Chem. Biol. 20, 583–593.

(* gemeinsame Erstautoren)

Kristin Koschinsky, Julia Schiekkel, Vivien-Isabell Kocher, Günter Schlichthörl, Vijay Renigunta, Jürgen Daut* & Regina Preisig-Müller*. Heme oxygenase 2 interacts with the potassium channel TREK-1 and modulates its open probability by producing carbon monoxide. **(noch unveröffentlicht)**.

Xinle Zou, Linus Conrad, **Kristin Koschinsky**, Günter Schlichthörl, Regina Preisig-Müller, Jürgen Daut* & Vijay Renigunta*. The phosphodiesterase inhibitor IBMX blocks the potassium channel THIK-1 from the extracellular side. **(noch unveröffentlicht)**.

Kongressbeiträge:

Internationales K₂P-Kanal Symposium in Marburg 2013

K. Koschinsky, V. Kocher, J. Schiekkel, G. Schlichthörl, J. Daut, R. Preisig-Müller. The role of heme oxygenase 2 and carbon monoxide in the regulation of TREK-1.

M. Bodnar, **K. Koschinsky**, J. Daut. TREK-1 currents in rat ventricular cardiomyocytes.

92. Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Heidelberg 2013

K. Koschinsky, V. Kocher, G. Schlichthörl, J. Daut, R. Preisig-Müller. Activation of TREK-1 by carbon monoxide and nitric oxide. Acta Physiologica P112, S.188

International meeting of the Collaborative Research Center (SFB) 593, Marburg 2012

K. Koschinsky, A. Schubert, G. Schlichthörl, J. Daut, R. Preisig-Müller. The role of heme oxygenase 2 and carbon monoxide in the regulation of the potassium channel TREK-1.

91. Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Dresden 2012

K. Koschinsky, A. Schubert, G. Schlichthörl, J. Daut, R. Preisig-Müller. The role of heme oxygenase 2 and carbon monoxide in the regulation of the potassium channel TREK-1. Acta Physiologica P172, S.235

10.3 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine Akademischen Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Aigner, Bastians, Bauer S., Bauer U., Baranowski, Becker,
Boekhoff, Brehm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dietrich,
Eilers, Elsässer, Feuser, Garn, Garten, Glorius, Grzeschik, Gudermann, Hasilik,
Hassel, Huber, Jacob, Kaufmann, Kira, Kirchner, Knöller, Koolman, Krebber,
Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Müller, Müller-Brüsselbach, Oliver,
Petz, Plant, Preisig-Müller, Röhm, Röper, Schäfer, Schütz, Seitz, Suske, Voigt,
Weihe, Westermann

10.4 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Daut bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und der mich in dieser Zeit stets gefördert und unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Regina Preisig-Müller für die Unterstützung bei der Projektumsetzung, sehr gute Diskussionen und für Ihre Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Dr. Julia Schiekel danke ich sehr für die Durchführung der Patch-Clamp Messungen, Dr. Günter Schlichthörl danke ich für hilfreiche Tipps bei allen elektrophysiologischen Messungen, bei der Auswertung dieser Messungen und für seine Unterstützung bei jeglichen Computerproblemen. Andrea Schubert danke ich für die Unterstützung in der Molekularbiologie und Brigitte Burk für die Präparation der Oozyten.

Bei Prof. Oliver und Bettina Wilke möchte ich mich sehr für die Einführung in die Giant Patch Methode bedanken.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitarbeiter der AG Daut:

Dr. Mandy Bodnar, Dr. Wiebke Milani, Dr. Vijay Renigunta, Dr. Thomas Fischer, Wei Tu, Katrin Grothus, Stefan Kling, Xinle Zou, Linus Konrad, Doris Wagner, Kirsten Ramlow und Susanne Bamerny für produktive und nette Gespräche und eine gute Laboratmosphäre.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Institutswerkstatt für ihre Hilfe bei technischen Problemen, besonders Kersten Schneider und Simon Bubel.

Vielen lieben Dank auch den Korrekturlesern dieser Arbeit: Dr. Mandy Bodnar, Dr. Günter Schlichthörl und Dr. Julia Schiekel.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich stets sehr unterstützt haben. Ein herzlicher Dank geht auch an Frederik, der in dieser Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich auch in schwierigen Zeiten immer wieder motiviert hat.

10.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Die ehrenwörtliche Erklärung wurde aus Datenschutzgründen aus der Arbeit entfernt.